



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN  
ABDELLAH  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE FES



## **Projet de Fin d'Etudes**

**Licence Sciences &  
Techniques**

**«Biotechnologie et Valorisation des  
PhytoRessources»**

**Teneur en flavonoïdes et activité  
antioxydante et  
antiproliférative de l'extrait méthanolique du Marrube  
Blanc.**

**Présenté par :** LAAOUICHI Fatima Zahra

**Encadré par :** Pr .MIKOU Karima

**Soutenu le :** 15/06/2015

Devant le jury composé de :

- Mme MIKOU Karima
- Mr RACHIQ Saad
- Mr BOUKIR Abdellatif

**Année universitaire 2014/2015**

# **Dédicace**

Je dédie ce travail

**A mes très chers parents :**

Aucun terme et aucune langue ne pourra exprimer mon amour et mes sentiments envers vous. Dieu seul capable de vous récompenser pour tout ce que vous faites pour moi.

**A mes formateurs :**

S'il y a vraiment quelqu'un à remercier ça sera vous.  
Merci pour vos efforts

**A tous mes chers amis :**

Je vous souhaite une vie pleine de joie et de réussite

# **Remerciements**

Ce rapport est le fruit d'un stage de deux mois effectué à la **Faculté Des Sciences et Techniques Fès Sais au Laboratoire de Molécules bioactives structures et fonctions du Département des Sciences de La Vie.**

La Faculté des Sciences et Techniques de Fès a été créée en 1995. Elle fait partie d'un réseau national formé de 6 autres établissements du même genre situés à Béni Mellal, Er-Rachidia, Marrakech, Mohammedia, Settat et Tanger auquel est ajouté dernièrement la FST d'Al-Hoceima. Les facultés des Sciences et Techniques sont des établissements universitaires à caractère scientifique et technique. Elles ont été créées dans le but de développer et de diversifier les formations offertes aux bacheliers scientifiques en vue d'une meilleure intégration de l'Université dans son environnement socio-économique.

Le département de Biologie renferme 3 laboratoires :

- Laboratoire de Biotechnologie microbienne.
- Laboratoires de Molécules bioactives, structures et fonctions.
- Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement.

Je remercie tout d'abord Dieu, tout puissant, de m'avoir donné le courage et la bonne volonté pour réaliser ce travail.

Je remercie également, **Mme MIKOU Karima**, ma professeur et mon encadrant de la FST, pour ses précieux conseils, pour sa disponibilité, pour son aide, sa rigueur qui ont été pour moi un modèle à suivre au cours de ce projet, je la remercie d'avoir accepté de m'encadrer et de suivre l'évolution de mon projet.

Que les Professeurs **RACHIQ Saad, et Boukir Abdellatif**, veuillent trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de bien vouloir examiner ce travail malgré leurs diverses occupations. Qu'ils soient assurés de ma vive reconnaissance

# Sommaire

Introduction Générale.....	1
1 ère partie : Etude bibliographique.....	3
I. Quelques données sur le Marrube blanc.....	3
1- Classification et description botanique.....	3
2- Propriétés médicinales du Marrube blanc .....	3
3- Parties utilisées et formes d'administration.....	3
4- Les principes actifs du Marrube blanc .....	4
II. Les Flavonoïdes.....	4
1- Introduction.....	4
2- Définition et répartition des flavonoïdes.....	4
3- Structure chimique et classification.....	5
4- Extraction, solubilité et dosages des flavonoïdes.....	5
5- Propriétés biologiques des flavonoïdes.....	5
6- Utilisation thérapeutique des flavonoïdes .....	5
III. Activités biologiques des plantes.....	6
1- Introduction.....	6
2- Activité antioxydante.....	7
3- Activité antiproliférative.....	7
2ème partie : matériel végétal et méthode .....	9
I- Matériel végétal : Marrubium vulgare.....	9
II- Méthodes expérimentales.....	11
1- Séchage de la plante :.....	11

2-	Préparation des poudres végétales .....	.11
3-	Perte à la dessiccation en eau .....	11
4-	Extraction et dosage des flavonoïdes.....	12
5-	Détermination du poids du résidu méthanolique.....	13
6-	Activité antioxydante :.....	13
7-	activité antiproliférative.....	14
3 <sup>ème</sup>	partie : Résultats.....	16
I-	Poids du résidu méthanolique.....	16
1-	Quantification des flavonoïdes.....	16
2-	Evaluation de l'activité antioxydante .....	18
3-	Evaluation de l'Activité antiproliférative .....	21
4 <sup>ème</sup>	partie : DISCUSSION.....	23
	Conclusion .....	25
	Références bibliographiques.....	26
	Résumé .....	28

## **Liste des tableaux et figures**

Figure1. Structures chimiques des flavonoïdes

Figure 2.Marrubiumvulgare.a- Stade végétatif; b stade reproducteur

Figure 3. Schéma du protocole expérimental

Figure4 : Schéma du montage de chauffage à reflux

Figure5. Variation du poids du résidu méthanolique au niveau des feuilles et de la plante entière du marrube au stade végétatif (V) et reproducteur R)

Figure 6. Effet du stade de développement de la plante sur la teneur en flavonoïdes des feuilles et de la plante entière du Marrube

Figure7. Teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques de marrube séché à l'étuve ou à l'air libre

Figure8. Pourcentage d'inhibition du DPPH par des concentrations croissantes d'acide ascorbique

Figure9. Pourcentage d'inhibition du DPPH par des concentrations croissantes d'extraits méthanoliques de différentes drogues de marrube

Figure 10. Pourcentage d'inhibition du DPPH par des concentrations croissantes d'extrait de feuilles de marrube à l'état végétatif

Figure 11. Pourcentage d'inhibition du DPPH par des concentrations croissantes d'extrait de plante de marrube à l'état végétatif

Figure 12. Courbe étalon traduisant la densité optique (DO) en fonction du nombre de cellules /ml

Figure 13. Evolution des populations cellulaires en présence des extraits de plante à l'état végétatif (V) et reproducteur(R)

Tableau 1 : Activité antioxydante de quatre extraits méthanoliques à

Différentes concentrations.

# Introduction Générale

Pendant longtemps, les plantes médicinales ont été une source inépuisable et bénéfique de médicaments pour guérir un grand nombre de pathologies, souvent mortelles, sans savoir à quoi étaient dues leurs actions.

Jusqu'à présent, sur les 300000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques (Verpoorte, 2002), ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré.

Par ses contrastes géographiques, le Maroc offre une gamme variée de bioclimats méditerranéens permettant une flore riche constituée de plus de 4200 espèces et une végétation variée, à endémisme très marqué. Les espèces à intérêt aromatique et/ou médicinales sont estimées à 500 à 600 espèces dont un grand nombre sont endémiques (verpoorte, 2002).

Parmi les plantes médicinales recensées auprès des populations et bénéficiant de bonnes renommées thérapeutiques qui devront être mises à l'épreuve d'investigations sérieuses de décryptages chimiques et biologiques, le *Marrubium vulgare*. Cette espèce, très riche en tanins et flavonoïdes, est largement utilisée dans le bassin méditerranéen pour ses nombreuses vertus thérapeutiques. Elle est employée par les tradipraticiens contre le diabète, les infections des voies respiratoires et les troubles de la sécrétion biliaire, les affections bronchiques aiguës bénignes et les rhumes (Sijelmassi, 2000).

Cependant, malgré ces différentes vertus, peu de travaux se sont intéressés à ses composants chimiques à intérêt thérapeutique et à leur mode d'action pharmacologique. On sait très peu sur ses activités biologiques. Or, des nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé (Bruneton, 2009).

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

Par ailleurs, l'intérêt accru des antioxydants d'origine naturelle dans le but d'augmenter la conservation des aliments est de plus en plus important et s'explique par le fait que certains antioxydants synthétiques présentent des risques de cancérogénicité.

Ainsi, l'ensemble de ces raisons, en particulier l'usage traditionnel de la plante pour des fins thérapeutiques, nous ont poussés à valoriser cette espèce endémique végétale qu'est le Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* en cherchant à démontrer des activités biologiques intéressantes et à quantifier la teneur de la plante en flavonoïdes en rapport avec différents paramètres tels que le mode de séchage de la plante, le stade de développement de la plante ainsi que la partie de la plante considérée. Pour se faire, nous avons structuré notre travail comme suit :

- ❖ Récolte de la plante à différents stade de maturation
- ❖ Séchage de la plante à l'étuve ou à l'air libre pendant une période bien donnée jusqu'à obtention d'un poids constant
- ❖ Préparations des poudres végétales
- ❖ Extraction des flavonoïdes
- ❖ Dosage des flavonoïdes
- ❖ Evaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait flavonoidique par le test du DPPH.
- ❖ Mise en évidence de l'activité antiproliférative de l'extrait flavonoidique
- ❖ Evaluation de l'inhibition de la croissance cellulaire par les extraits flavonoidiques.



# Etude bibliographique

## I. Quelques données sur le Marrube blanc

### 1- Classification et description botanique

- ❖ Nom en français : Marrube blanc.
- ❖ Nom Scientifique : *Marrubium vulgare*.
- ❖ Nom commun : Marrube blanc, marrube commun, marrube vulgaire, marrube des champs, marrube officinal, bonhomme.
- ❖ Nom en arabe : الأبييض المرّي
- ❖ Nom marocain : مريوت
- ❖ Famille : Lamiaceae
- ❖ Prélèvement : Fès

Le marrube blanc est une plantepérenne herbacée, à l'odeur de thym. Il a une couleur grisâtre et peut atteindre 45 à 70 cm de hauteur. La tige est carrée. les feuillesont pétiolées, ovales, arrondies et duveteuses. Elles ont un aspect froissé.Le limbe est irrégulièrement crénelé sur les bords.Les fleurs sont blanches, petites groupées en verticilles globuleux à l'aisselle des feuilles.Le fruit est un tétrakène. Cette plante est originaire d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie. Le marrube est une plante pionnière, qui colonise les terres non cultivées, lesprairies sèches et les friches.

### 2- Propriétés médicinales du Marrube blanc

Le marrube blanc est utilisé depuis longtemps pour soulager la toux et comme antidote à certains poisons. Il sert encore aujourd'hui à traiter les infections des voies respiratoires ou encore des troubles digestifs. Mais, Il possède de nombreuses autres vertus. Il est en effet, expectorant; fluidifiant des sécrétions bronchiques; antitussif; anti-infectieux; stomachique ; diurétique ; tonique; cardiotonique et désinfectant.

### 3- Parties utilisées et formes d'administration

En phytothérapie, on utilise les sommités fleuries administrées le plus souvent en Infusion ou en décoction. L'action du marrube blanc pourrait également renforcer celles des plantes ou des compléments hypoglycémians. Il peut également avoir des Interactions

avec des médicaments, il pourrait augmenter les effets des médicaments contre l'hypoglycémie.

#### **4- Les principes actifs du Marrube blanc :**

Le marrube blanc contient un principe amer : la marrubine (lactones diterpéniques), de la choline, des hétérosides, des tanins, une cire contenant des stérols, des saponosides; des acides-phénols; des flavonoïdes; des mucilages, des huiles essentielles, beaucoup de nitrates et du fer. (<http://www.doctissimo.fr/html/sante/phytotherapie/plante-medicinale>).

## **II- Les Flavonoïdes**

### **1- Introduction**

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent tels que les parasites, les pathogènes et les prédateurs. Ils permettent également aux plantes de résister aux conditions environnementales inadéquates. Ils sont en plus responsables de la qualité thérapeutique de la plante. Ces différents rôles ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires ; mais, ils sont le plus souvent classés en trois catégories principales :

- composés phénoliques dont les flavonoïdes
- terpènes et stéroïdes,
- alcaloïdes.

### **2- Définition et répartition des flavonoïdes**

Les flavonoïdes, au sens large, sont des pigments quasiment universels des végétaux (Rice-Evans et al, 1996). Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les Dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes. Ces diverses structures se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides.

Les flavonoïdes se trouvent, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires ; mais, ils sont particulièrement abondants dans certaines familles: Polygonaceae, Rutaceae,

Légumineuses, Ombellifères et Composeae (Paris et Hurabielle, 1980). Ces métabolites peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

### **3- Structure chimique et classification :**

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles benzéniques C<sub>6</sub> reliés par une chaîne en C<sub>3</sub>. Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone.

Les flavonoïdes peuvent être regroupés en plusieurs classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central. On distingue les hétérosides flavonoïdiques, les anthocyanes, les isoflavonoïdes et les flavonoïdes au sens strict comprenant les flavones, les flavonols, les dihydroflavonols, les flavanones ainsi que les aurones et les chalcones (Bruneton, 2009).

### **4- Solubilité, extraction et dosage des flavonoïdes**

Les génines sont pour la plupart, solubles dans les solvants organiques apolaires. Les hétérosides peuvent être extraits, le plus souvent à chaud, par de l'acétone ou par des alcools additionnés d'eau. Les méthodes de dosage classiques sont le plus souvent, colorimétriques ou spectrophotométriques (Bruneton, 2009).

### **5- Propriétés biologiques des flavonoïdes**

Les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées. On leur reconnaît des activités anti-inflammatoires, anticancéreuses et anti fongiques. Ils peuvent agir également comme antioxydants primaires, en stabilisant les radicaux peroxydes mais ils peuvent aussi désactiver les espèces oxygénées réactives.

### **6- Utilisation thérapeutique des flavonoïdes :**

Les flavonoïdes sont essentiellement utilisés dans le domaine capillaro-veineux; seuls ou associés, ce sont les constituants habituels des vasculo-protecteurs et veino-toniques et des toniques utilisés en phlébologie. Ils sont ainsi utilisés pour :

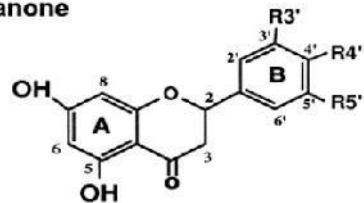
- Le traitement des symptômes en rapport avec l'insuffisance veino -lymphatique (jambes lourdes, douleurs).

- Le traitement des signes fonctionnels liés à la crise hémorroïdaire.
- L'amélioration des troubles de la fragilité capillaire au niveau de la peau.
- Le traitement des métrorragies lors de la contraception par micro progestatifs et des métrorragies dues au port du stérilet.

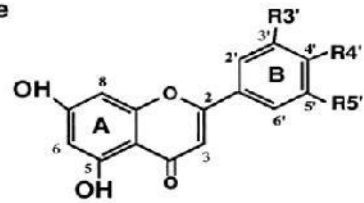
Le traitement des troubles impliquant la circulation rétinienne et/ou choroïdienne.

Le traitement du lymphœdème du membre supérieur après traitement radio-chirurgical du cancer du sein (Bruneton, 2009).

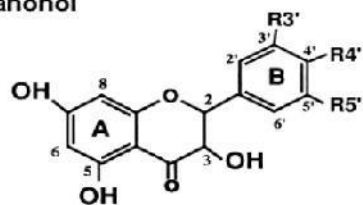
**flavanone**



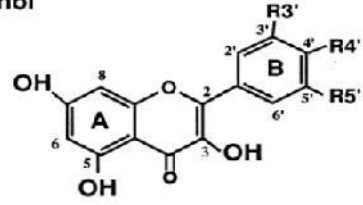
**flavone**



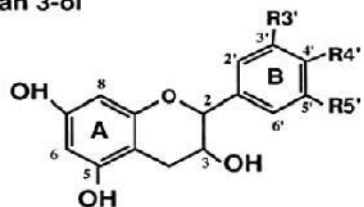
**flavanonol**



**flavonol**



**flavan 3-ol**



**isoflavone**

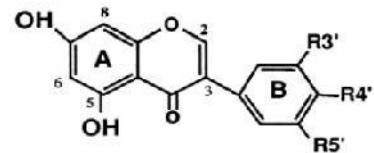


Figure1. Structures des différentes classes de flavonoïdes

### **III- Activités biologiques des plantes**

#### **1- Introduction**

Les plantes, grâce à leurs composés chimiques, sont douées d'activités biologiques importantes dont l'activité antioxydante ou anticancéreuse. Mais, d'autres activités sont reconnues aux plantes ; activité antifongique, antivirale, insecticide, etc.

#### **2- Activité antioxydante**

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS (reactive oxygen species). Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

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

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne (Dacosta, 2003).

De nos jours, il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres, ceci est dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme et à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (Guinebert et al, 2005).

### 3- Activité antiproliférative

Les plantes constituent un réservoir de molécules ayant une activité antimittotique vis-à-vis des cellules eucaryotes, partant contre les cellules cancéreuses.

Pour la mise en évidence des antimittotiques plusieurs méthodes sont utilisées :

- Test à la tubuline : basé sur l'inhibition de l'assemblage de la tubuline en microtubules ou sur l'inhibition de la désagrégation des microtubules.
- Test sur les œufs d'oursin en division : il s'agit d'un test d'inhibition de division de l'œuf d'oursin.*f*
- Test sur les cultures cellulaires : il permet d'évaluer l'effet sur la croissance cellulaire des extraits des plantes.
- La cytométrie de flux: analyse le cycle cellulaire. Elle permet de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle en fonction de divers stimuli ou de l'ajout de certaines drogues.

# Matériel végétal et Méthodes

## I- Matériel végétal : *Marrubium vulgare*

L'étude menée est réalisée sur le marrube blanc (*Marrubium vulgare*) de la famille des Lamiaceae. Les plantes sont récoltées au stade végétatif au mois de mars puis au stade reproducteur au mois de mai. La figure 2 montre l'aspect de la plante aux différents stades de son développement.

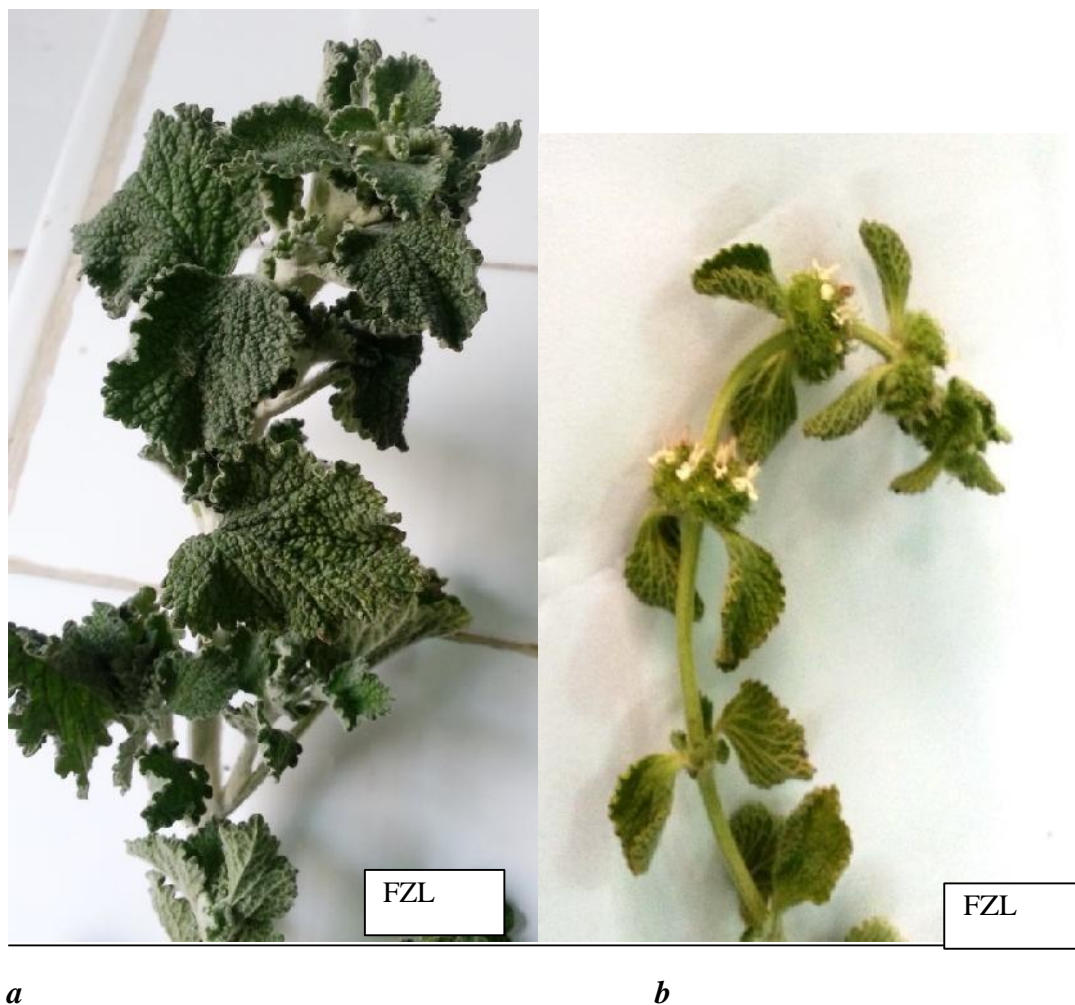
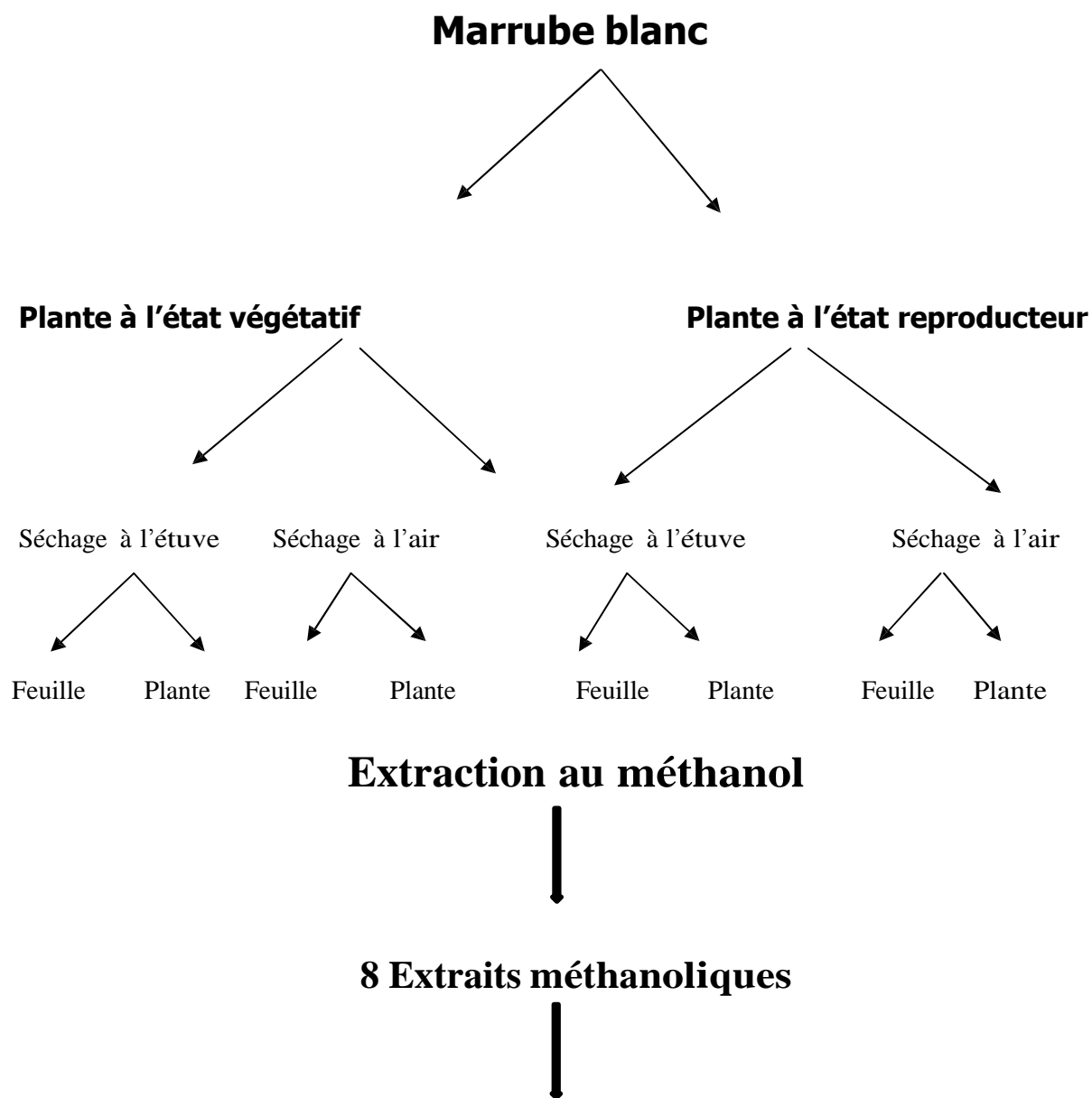


Figure 2. *Marrubium vulgare*. a- Stade végétatif; b stade reproducteur

Les plantes récoltées sont séparées en deux lots qui sont séchés à l'étuve ou à l'air libre. Les plantes séchées sont réduites en poudre qui ont servi à la quantification des flavonoïdes et puis à l'évaluation de l'activité antioxydante et antiproliférative des extraits de plante. La figure 3 illustre le protocole expérimental suivi.



Quantification des flavonoïdes - Evaluation de l'activité antioxydante et de l'activité antiproliférative

**Figure 3. Schéma du protocole expérimental**



## **II- Méthodes expérimentales**

### **1- Séchage de la plante :**

Le séchage a lieu à l'étuve à 60°C ou à l'air libre dans une salle aérée à l'ombre et à la température ambiante. Avant le séchage le poids du lot est déterminé il sert à la détermination de la teneur en eau de la plante et à surveiller le séchage.

Deux lots de plantes, l'un contient la plante à l'état végétatif et l'autre à l'état reproducteur ont été séchés. Le poids des différents lots est noté régulièrement et le séchage est arrêté lorsque le poids devient constant.

### **2- Préparation des poudres végétales :**

Les plantes séchées sont réduites en poudre à l'aide d'un mortier. Pour chaque lot, on prépare une poudre à partir des feuilles et une autre contenant la plante entière. Les huit poudres résultantes sont mises dans des flacons en verre. Elles sont conservées à l'abri de la lumière.

### **3- Perte à la dessiccation en eau :**

#### **a- Principe**

Le dosage de l'eau dans les drogues végétales permet de vérifier leur bonne conservation. Une dessiccation insuffisante peut entraîner le développement des moisissures ou levures. La perte à la dessiccation à l'étuve est limitée à 10% maximum après dessiccation pendant 2 heures.

#### **b- Technique :**

- On introduit dans un cristalliseur préalablement séché à l'étuve, refroidi dans un dessiccateur et taré 1,000g de poudre pulvérisée exactement pesée.
- On porte à l'étuve à 100-105°C pendant 2 heures, on laisse refroidir dans un dessiccateur et on pèse.
- On calcule alors la teneur en eau pour 100 g de drogue.

#### 4- Extraction et dosage des flavonoïdes :

##### a- Préparation de la solution mère :

- On introduit dans un ballon rodé de 250ml environ 1,00g exactement pesé de poudre végétale.
- On verse 90 ml de méthanol, on agite 10 minutes, on place le réfrigérant , puis on chauffe à reflux pendant 50 minutes : Un chauffage à reflux accélère la réaction. Le reflux empêche la perte des composés volatils par vaporisation.
- On laisse refroidir, et on filtre dans une fiole jaugé de 100ml.
- On complète à 100 ml avec du méthanol. Ceci constitue l'extrait méthanolique.
- On prélève 10 ml de cette solution et on complète à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Ceci constitue la solution mère.

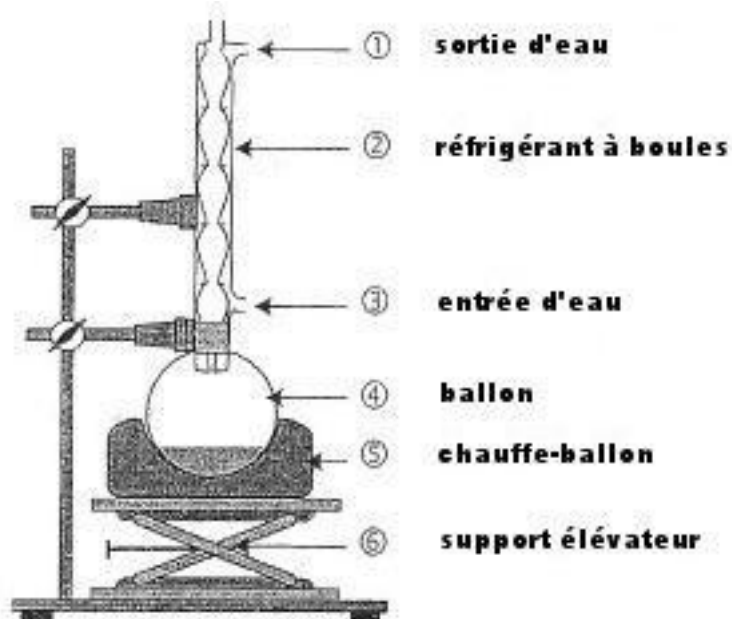


Figure 4 : Schéma du montage de chauffage à reflux

##### b- Dosage colorimétrique des flavonoïdes( à UV)

- La concentration des flavonoïdes totaux a été mesurée par la méthode colorimétrique standard de chlorite d'aluminium d'après la monographie générale « drogues végétale de la pharmacopée européenne »
- Le trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) forme un complexe jaune avec les flavonoïdes. Ce complexe absorbe à 425 nm.

- Le dosage est effectué comme ceci :
- On Prélève 10 ml de la solution mère+ 10 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium (20g/l) fraîchement préparée.
- Après 15 min, on mesure l'absorbance de cette solution à 425 nm par rapport à la solution de compensation (blanc).
- La quantification des flavonoïdes à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un standard étalon « le rutoside »
- La teneur en flavonoïdes totaux des différents extraits étudiée est exprimée en % de la matière végétale sèche. Pour chaque extrait de plante, la valeur donnée est une moyenne de trois dosages.

## 5- Détermination du poids du résidu méthanolique

Dans le but de concentrer notre extrait méthanolique et récupérer un extrait brut, on utilise le rotavapeur (à 40°C) qui permet d'éliminer le solvant jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Le ballon est pesé avant (Pi) et après l'évaporation (Pf). Le poids du résidu correspond à la différence entre Pf et Pi avec Pf = poids du ballon après évaporation, Pi = poids du ballon vide.

## 6- Activité antioxydante :\_Dosage de l'activité antiradicalaire par le test au DPPH(2,2'-diphenyl-1-picryllhydrazyle).

### a- Principe :

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



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

b- **Technique :**

b 1- Préparation des solutions :

- On prépare l'acide ascorbique à 20 mg /100ml du méthanol.
- On prépare une gamme de concentration d'acide ascorbique : 0, 1, 2,5, 10, 100µg/ ml.
- On prépare une gamme de concentrations pour chaque extrait de plante : 0-1-2-5-10-100 µg/ml.
- On prépare du DPPH (100µM) dans du méthanol :

b 2- Tests :

***2,5 ml(Essai) + 2,5 ml DPPH***

***Incubation ESSAI : Acide ascorbique ou Extrait de plante***

- On incube pendant 30 min, à 25°C et à l'obscurité.
- On Mesure la DO à 517 nm contre un blanc qui ne contient que du méthanol.
- On Calcule le pourcentage d'inhibition du radical DPPH selon l'équation suivante :
- Inhibition du DPPH en (%)=  $[1 - (DO \text{ essai} / DO \text{ blanc}) * 100]$
- On détermine la CI50 qui est la concentration d'extrait de plante ou de l'acide ascorbique responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH, sur le graphique représentant le % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits de plante et de l'acide ascorbique .

**7- Activité antiproliférative :**

Pour l'évaluation de l'inhibition, par les extraits de plantes, de la croissance cellulaire. La souche de cellules eucaryotes utilisée est la levure de bière ou *Saccharomyces cerevisiae*. Cette cellule a l'avantage d'être une cellule eucaryote et donc ayant les mêmes mécanismes fondamentaux de régulation du cycle cellulaire que toutes les autres cellules eucaryotes.

a. **Culture de *Saccharomyces cerevisiae* en milieu liquide :**

a-1- Réactivation des levures de commerce.

Cette étape est effectuée dans un Erlen Meyer contenant 125 ml de milieu de culture et 2g de levure lyophilisée de commerce, cette réaction se fait à 30°C pendant 24h.

La culture de cellule se fait sur un milieu de composition suivante :

- Bactopeptone : 5g
- Glucose : 12,5g
- Eau distillée : 350ml
- Tampon phosphatepH=3,8:150 ml

a-2 Préparation d'une suspension mère de levures

On prépare ensuite une suspension mère de levures qui a comme densité optique 0,1. La mesure de la densité optique se fait à la longueur d'onde de 650nm.

**b. Test :**

- 2,5 ml d'extrait à différentes concentrations (0, 1, 2, 5,10 µg/ml) + 2,5 ml de suspension mère de levure dont la DO=0,1.
- On Laisse agiter pendant 24h, puis on mesure la densité optique à 650 nm, à fin de mesurer la croissance de la levure, celle ci est déterminée en se référant à une courbe étalon.

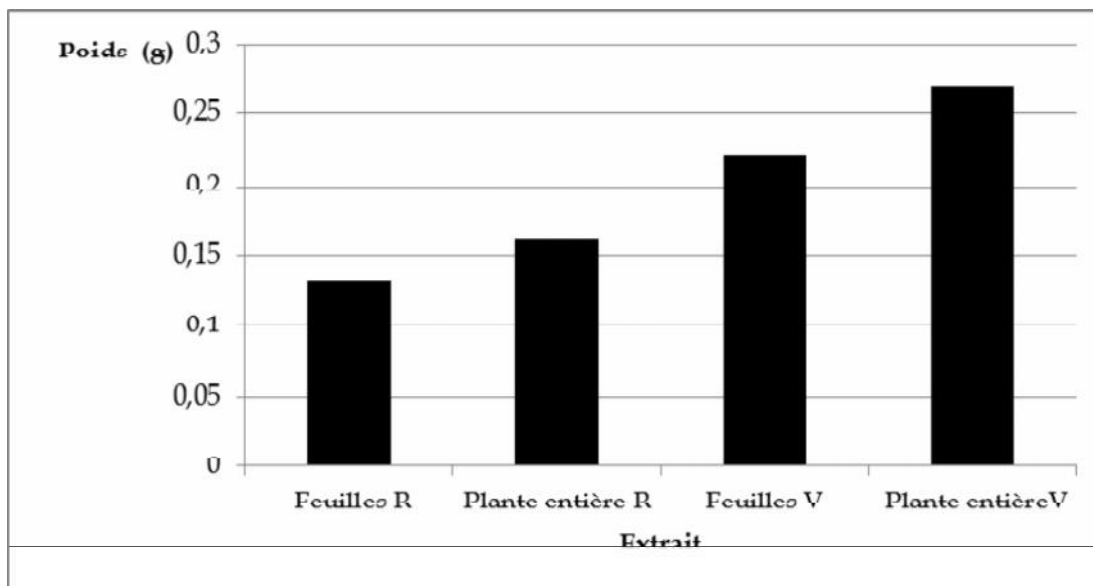
**c. Courbe d'étalonnage :**

- On Prépare une suspension mère de levures dont la D0=1
- A l'aide de la cellule de Malassez, on fait une numérotation à partir d'un aliquote de 10µl, soit C1 la concentration cellulaire correspondante.
- On fait ensuite des dilutions de demi en demi dans des cuves de spectroscopie et on lit la DO qui correspond à chaque dilution.
- On trace la courbe d'étalonnage

# Résultats

## I- Poids du résidu méthanolique

La variation du poids du résidu méthanolique de la plante et des feuilles du marrube au stade végétatif et au stade reproducteur est illustrée par la figure 5. On constate que quelque soit le stade de développement, le poids du résidu au niveau de la plante est supérieur à celui au niveau des feuilles. La figure montre également que c'est pendant le stade végétatif que l'extrait méthanolique est le plus concentré en substances.



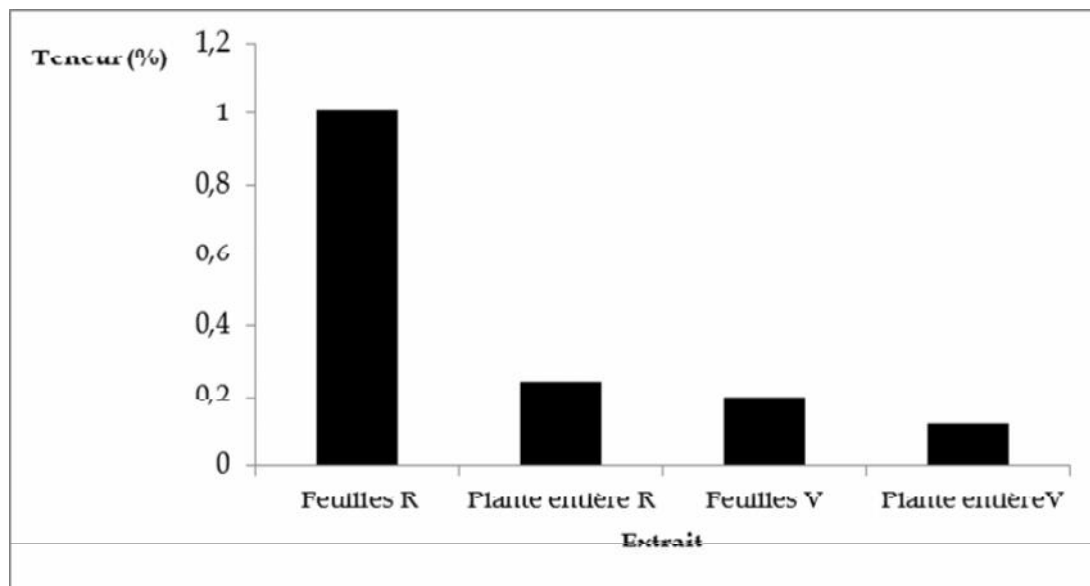
**Figure 5. Variation du poids du résidu méthanolique au niveau des feuilles et de la plante entière du marrube au stade végétatif (V) et reproducteur R)**

### **1- Quantification des flavonoïdes :**

#### **a-Effet du stade de développement de la plante sur la teneur en flavonoïdes**

La teneur en flavonoïdes des différents extraits du marrube est représentée par la figure 6 qui montre que quelque soit le stade de développement de la plante, ce sont les feuilles qui sont le plus pourvues en flavonoïdes. On peut constater que le stade reproducteur se traduit

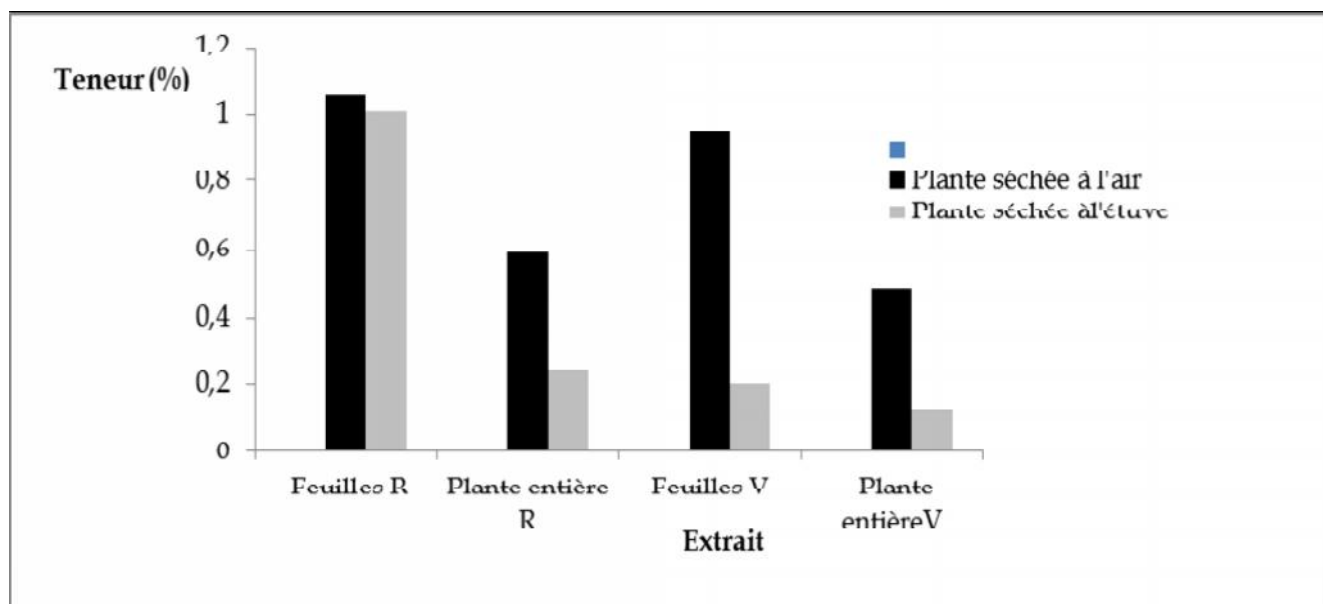
par une augmentation de la teneur en flavonoïdes surtout au niveau des feuilles dont la teneur devient 5 fois supérieure à celle des feuilles au stade végétatif.



**Figure 6. Effet du stade de développement de la plante sur la teneur en flavonoïdes des feuilles et de la plante entière du Marrube R= Plante au stade reproducteur ; V= Plante au stade végétatif.**

**b- Effet du mode de séchage de la plante sur la teneur en flavonoïdes**

Le mode de séchage et de préparation de la drogue peut influencer sa teneur en métabolites. La figure représente cette teneur au niveau de différentes drogues végétales séchées à l'étuve ou à l'air libre. On peut constater que le séchage à l'air libre est le plus favorable à la conservation d'un taux élevé en flavonoïdes.



**Figure 7. Teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques de marrube séché à l'étuve ou à l'air libre**

## 2- Evaluation de l'activité antioxydante :

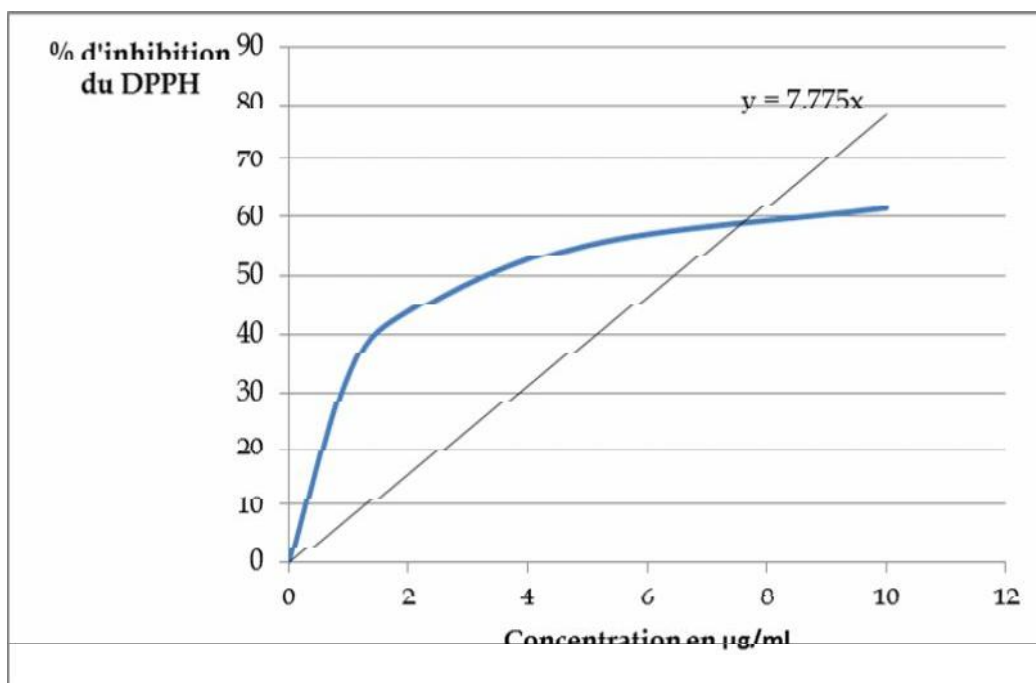
L'activité antioxydante est recherchée et évaluée au niveau de quatre extraits méthanoliques de plantes, séchées à l'air libre, du fait que c'est ce mode de séchage qui est le plus favorable à la conservation des composés actifs, en particulier la teneur en flavonoïdes.

**Tableau 1:** Activité antioxydante de quatre extraits méthanoliques à différentes concentrations.

Concentration \ Extrait	0	1µg/ml	2µg/ml	5µg/ml	10µg/ml	100µg/ml
Acide ascorbique	0,11%	32,77%	43,69%	55,46%	61,34%	91,59%
FEUILLES V	0,45%	3,77%	8,26%	15,33%	17,77%	37,11%
FEUILLES R	0,43%	6,95%	13,82%	32,44%	-17%	14,38%
PLANTES ENTIERES V	0,41%	3,01%	3,30%	7,15%	46,67%	76,14%
ER Plante entières R	0,42%	10,23%	6,30%	5,64%	8,48%	39,41%

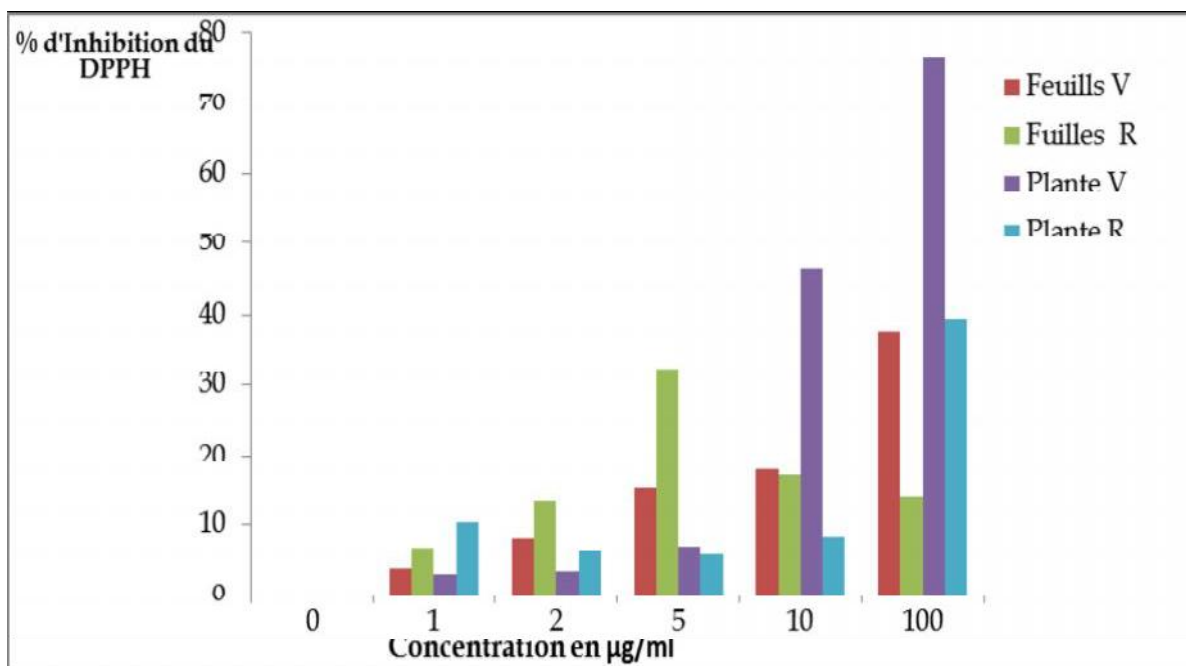


L'acide ascorbique, un antioxydant de référence présente une activité inhibitrice du DPPH. Cette activité augmente avec l'augmentation de la concentration. La droite de régression présentée par la figure 8 permet de calculer la concentration de l'acide ascorbique permettant 50 % d'inhibition du DPPH Cette concentration est égale à 23,98 µg/ml.

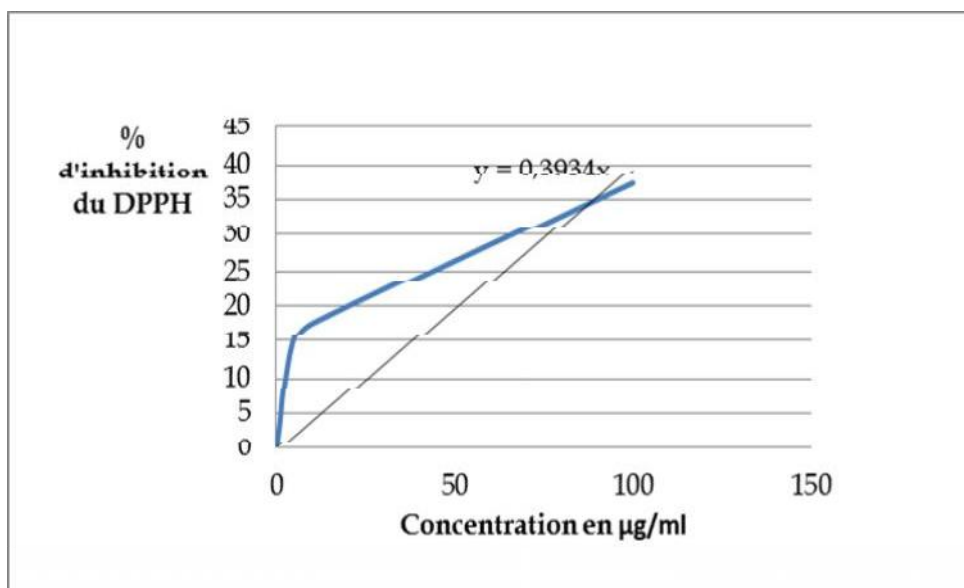


**Figure8. Pourcentage d'inhibition du DPPH par des concentrations croissantes d'acide ascorbique**

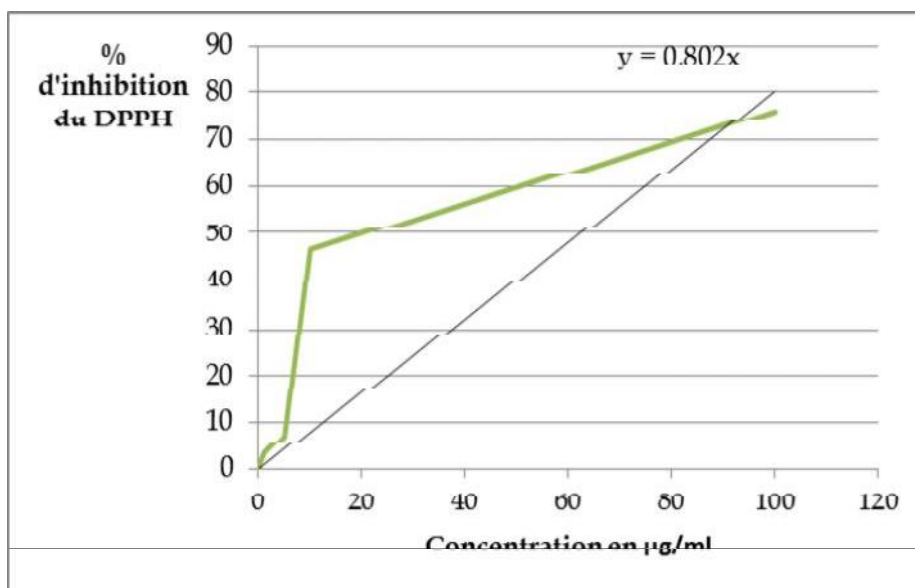
Les différents extraits testés ont montré une activité plus ou moins importante selon le type de l'extrait. (figure 9). Ce sont les plante à l'état végétatif qui possèdent l'activité la plus importante (76 %). , Les feuilles des plantes végétatives ont également une activité importante. L'équation de régression établie (figures 10 et 11) permet de calculer la CI50 pour les deux extraits qui est égale à 128 µg/ml pour les feuilles et de 62, 5 pour la plante.



**Figure 9. Pourcentage d'inhibition du DPPH par des concentrations croissantes d'extraits méthanoliques de différentes drogues de marrube**



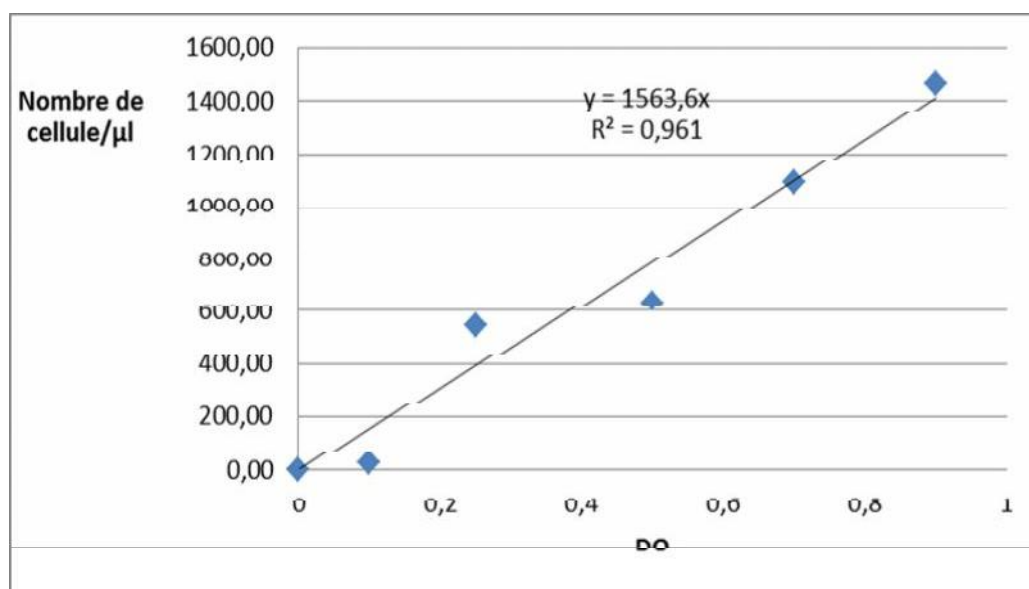
**Figure 10. Pourcentage d'inhibition du DPPH par des concentrations croissantes d'extrait de feuilles de marrube à l'état végétatif**



**Figure 11. Pourcentage d'inhibition du DPPH par des concentrations croissantes d'extrait de plante de marrube à l'état végétatif.**

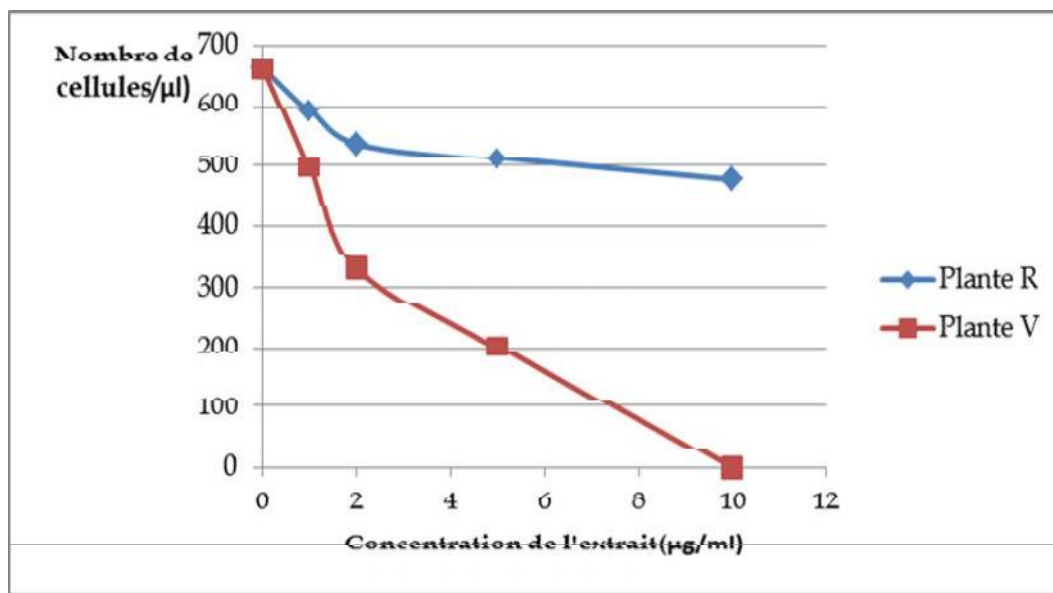
### 3- Evaluation de l'Activité antiproliférative :

L'activité antiproliférative est recherchée au niveau de différents extraits de plante. Cette activité est déterminée par référence à une courbe étalon établie à partir des concentrations connues de *Saccharomyces* (figure 12).



**Figure 12. Courbe d'étalonnage traduisant le nombre de cellules /µl en fonction de la densité optique (DO)**

La figure 13 traduit l'activité antiproliférative relevée. Les extraits qui réduisent la croissance cellulaire sont les extraits obtenus à partir de plante entière. Néanmoins, il semble que c'est l'extrait de plante à l'état végétatif qui est le plus actif. Une concentration de 10  $\mu\text{g/ml}$  entraîne une inhibition totale de la croissance cellulaire.



**Figure 13. Evolution des populations cellulaires en présence des extraits de plante à l'état végétatif (V) et reproducteur(R)**

# Discussion

L'objectif de cette étude, réalisée dans le cadre d'un stage de fin d'étude de deux mois était d'abord de quantifier les flavonoïdes au niveau des extraits méthanoliques en fonction de plusieurs paramètres liés à la plante et sa préparation, puis d'évaluer l'activité antioxydante et l'activité antiproliférative de cette plante.

La teneur des flavonoïdes au niveau de la plante diffère d'un stade de développement à l'autre, elle est plus importante au niveau des feuilles. Le stade reproducteur se traduit par une élévation de la teneur en flavonoïdes aussi bien au niveau des feuilles qu'au niveau de la plante entière. Ces résultats sont conformes à ceux décrits dans la littérature. Des travaux antérieurs ont rapporté une localisation des flavonoïdes dans les organes aériens qui ont une teneur maximale en particulier les organes jeunes, les feuilles et les boutons floraux (Paris et Hurabielle, 1980).

Les flavonoïdes s'accumulent dans la cuticule ou dans les vacuoles des cellules épidermiques des feuilles, leur synthèse au niveau des feuilles est impliquée lors des mécanismes de défense de la plante. Il est privilégié dans le cas de facteurs environnementaux défavorables par exemple stress hydrique, maladies, carences nutritionnelle (Agati et al. 2008 ; Latouche et al. 2013),

De plus, l'intensité lumineuse est le premier facteur de variabilité des flavonoïdes c'est pourquoi ces métabolites se trouvent concentrés au niveau des feuilles bien exposées à la lumière.

Les résultats obtenus montrent clairement que le type de séchage a une influence sur la quantité de flavonoïdes des plantes. Le séchage à l'air libre conserve plus de flavonoïdes que le séchage à l'étuve. Ceci peut être dû à la poursuite de la synthèse des métabolites secondaires à l'air libre, cette synthèse peut être perturbée par l'étuve.

Pour les activités biologiques testées, la majorité des extraits ont montré un résultat positif. Néanmoins, nos résultats ont montré que c'est la plante à l'état végétatif qui possède l'activité la plus importante. Or les flavonoïdes sont plus concentrés au niveau des feuilles, ceci montre que les activités biologiques peuvent être dues à d'autres métabolites localisés au niveau de la plante. En effet, une plante est un réservoir de molécules biologiquement

actives distribuées différemment dans les différents organes de la plantes, ces métabolites agissent seuls ou en synergie et expliquent l'activité de la plante.

# Conclusion

La quantification des flavonoïdes dans les extraits méthanoliques bruts nous a permis de distinguer les parties de plante qui renferment plus de flavonoïdes. Quelque soit le stade de développement de la plante ce sont les feuilles qui sont le plus pourvues en flavonoïdes. L'état reproducteur se traduit par une élévation de la teneur en flavonoïdes au niveau des feuilles et de la plante.

Les résultats ont également montré que le mode de séchage a une influence sur la teneur en flavonoïdes. C'est au niveau des plantes séchées à l'air libre que la teneur en flavonoïdes évaluée est la plus importante.

Quant à l'activité antioxydante, tous les extraits testés ont montré un résultat positif c'est-à-dire que la plante est douée d'une activité antioxydante. Cependant, c'est pendant le stade végétatif que l'activité évaluée est la plus importante et égale à 76,14% pour l'extrait méthanolique des plantes végétatives.

La plante est également douée d'une activité antiproliférative mise en évidence dans les extraits méthanoliques de plantes à l'état végétatif. Des concentrations croissantes de cet extrait entraînent une diminution de la croissance cellulaire.

Les résultats obtenus confirment que le Marrube Blanc renferme dans ses différentes parties des composés actifs, tels que les flavonoïdes connus par le potentiel antioxydant. Ces composés actifs procurent à la plante une autre activité biologique qui est l'activité antiproliférative.

# Références

## bibliographique

- 1) Agati G., Cerovic, Z. G., Dallas Marta, A., Di Stefano, V., Pinelli, P., Traversi, M. L., Orlandini, S. (2008). *Functional Plant Biology*, 35, 77-84.
- 2) Bruneton J., 1999. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, 3ème Ed : Tec & Doc Lavoisier. Paris. 1120 p.
- 3) Chen H.Q., Jin Z.Y., Wang X.J., Xu X.M., Deng L., Zhao J.W., 2008. Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neuroscience Letters*. 448 (2) :175-9.
- 4) Dacosta, les phytonutriments bioactifs, 669 références bibliographiques ED, Yves dacosta , paris, 2003 p 317.
- 5) DJAHRA Ali Boutlelis 2013. thèse : Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA., ALGERIE.
- 6) <http://www.doctissimo.fr/html/sante/phytotherapie/plante-medicinale>.
- 7) Favier A. Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* 2003; 108-117.
- 8) Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 2006; 64: 390-396.
- 9) Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole* 2005; 554-558.
- 10) Latouche, G., Bellow, S., Poutaraud, A., Meyer, S. and Cerovic, Z.G. (2013). *Planta* 237: 351-361
- 11) Marfak A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes: Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. Thèse de doctorat. Universités de Limoges, pp. 24-42., France.
- 12) Paris M., Hurabielle M., 1980. *Abrégé de matière médicale Pharmacognosie. Tome 1ère Ed* : Masson. Paris. pp. 82-89.
- 13) Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996. Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(7): 933-956.



14)Sijelmassi A (2000) Les plantes médicinales du Maroc. Edition Le Fennec.

15) Verpoorte R., 2002. La pharmacognosie du nouveau millénaire: pistes et biotechnologies. sources du savoir aux médicaments du futur, 4<sup>o</sup> congrès européen d'ethnopharmacologie. IEd: Paris, 274 p

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

# Résumé

*Marrubium vulgare* est une plante utilisée dans la médecine traditionnelle marocaine pour le traitement de diverses maladies. Dans le présent travail, nous avons préparé des extraits à partir des plantes à différents stades de leur développement.

Ces plantes séchées à l'étuve ou à l'air libre ont servi à la quantification des flavonoïdes et la mise en évidence des activités antioxydante et antiproliférative de la plante. L'activité antioxydante est évaluée par l'inhibition du radical DPPH.

L'activité antiproliférative est étudiée à l'aide d'un test sur des cultures cellulaires de *Saccharomyces*.

Nous avons montré que ce sont les feuilles qui renferment le plus de flavonoïdes. Le stade reproducteur de la plante se traduit par une élévation de la teneur en flavonoïdes au niveau des feuilles et de la plante entière. Un séchage à l'air libre est le plus favorable à une teneur importante.

Les activités biologiques, activité antioxydante et activité antiproliférative, mises en évidence, sont le plus importantes au niveau des extraits de plantes entières à l'état végétatif.

Mots clefs : *Marrubium vulgare*, *stade de développement*, *flavonoïdes*, *activités biologiques*.