



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**Activités antimicrobienne & anti-oxydante
des extraits aqueux et méthanolique du
Marrube blanc**

Présenté par : Naima El-Kiyar

Encadré par : Pr. Faouzi Errachidi (FST Fès)

Pr. Rachida Chabir (FMP Fès)

Soutenu le : 11/06/2019

Devant le jury composé de :

- Pr. Rachid Bencheikh
- Pr. Faouzi Errachidi
- Pr. Rachida Chabir

Stage effectué à : la FSTF et à la FMPE

Année universitaire 2018-2019

DÉDICACE

Je dédie ce travail

À

Mes très chers parents

Fatima benchrif et Mohammed el-kiyar Qui ont toujours été là pour moi tout au long de mes études et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

À mon cher frère et ma chère sœur

Fatima, Khadija, Zolikhha, Idriiss, Ibrahim & Said Pour leurs patiences et leurs soutiens qu'ils n'ont cessés de m'apporter au cours de ma formation

À ma famille

Que ce travail soit l'aboutissement de votre soutien et de vos encouragements.

À mes amis et amies

Qui m'ont aidé et m'encouragé durant toute cette période.

À tous ce qui m'aiment sincèrement

Je vous dédie ce modeste travail.

Remerciement

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

J'adresse mes remerciements au **Pr. Lahsen El Ghadraoui** pour l'opportunité d'effectuer mon stage au sein de son laboratoire d'Ecologie Fonctionnel et Environnement (EFE), ce qui m'a permis de découvrir le monde de la recherche et la connaissance de nouvelles personnes.

C'est avec gaité de cœur que j'adresse mon vif sentiment de reconnaissance et de respect à **Pr. Faouzi Errachidi** qui m'a encadré et m'a guidé le long de toute la durée de mon stage. Il s'est grandement impliqué dans la conduite de ce projet. Je tiens à le remercier aussi pour cette liberté qu'il m'a permis, sans laquelle je ne saurais affirmer ma manière de penser et de procéder.

J'exprime également ma profonde gratitude et immense respect au **Pr. Rachida Chabir** mon encadrante externe, enseignante chercheuse à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès.

Mes remerciements s'adressent également aux doctorantes **Meryem Benidir et Soukaina El Massoudi** au sein du laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour leurs encadrements, leurs aides, partages de leurs expertises au quotidien et leurs temps accordés. Toutes personnes ayant contribué d'une façon ou d'une autre à la réalisation de mon travail.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont également à **Mr Saïd Halloti**, notre chef de filière, ainsi à **Mr. Mustapha Ijjaali** le doyen de la FST FES et tout le corps administratif de la FST-FES en témoignage de notre reconnaissance.

Résumé

La présente étude ambitionne à valoriser une plante médicinale le *Marrube blanc*, en déterminant ses activités biologiques ; activité antimicrobienne, activité anti-oxydante et sa toxicité testée sur des souris, tout en comparant deux extraits aqueux et t méthanolique.

L'activité antimicrobienne a été testée sur deux souches de levures (*Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*) et deux souches de bactéries (*Escherichia coli* à Gram négatif et *Bacillus subtilis* à Gram positif. Elle a montré que l'extrait aqueux est très puissant contre les levures par rapport aux bactéries. En revanche l'extrait méthanolique est plus actif contre les deux levures, la bactérie *Bacillus subtilis* et inoffensif contre la souche *E.coli*.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux est plus riche en composés phénoliques et en flavonoïdes par rapport à l'extrait méthanolique. Ce qui justifie la puissance supérieure de l'activité anti-oxydante des extraits aqueux que celle des extraits méthanoliques.

En parallèle la chromatographie sur gel d'exclusion (Séphadex G50) a démontré la présence des monophénols, intermédiaires et les polyphénols dans les extraits aqueux. Cependant l'extrait méthanolique ne renferme que les monophénols. Le test de ces fractions sur des souris a montré la toxicité des monophénols d'extrait aqueux.

Mots clés : Marrube blanc, activité antioxydante, antimicrobienne, toxicité, marrubine.

Abstract

The present study is initiated to promote a medicinal plant *White Horehound*, by determining their biological activities; antimicrobial activity, antioxidant activity and toxicity tested in mice, while comparing between the aqueous extract and the methanolic extract of this plant.

The antimicrobial activity was performed on 4 strains; *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. She showed that the aqueous extract is potent tale *candida tropicalis* and *saccharomyces cereviciae* and not potent against *bacillus subtilis* and *E. coli*. On the other hand, the methanolic extract is active against *candida tropicalis*, *saccharomyces cereviciae* and *bacillus subtilis* and not active against *E. coli*.

The results obtained also showed the richness of aqueous extract in phenolic compounds and flavonoids that the methanolic extract, the fact that justifies the powerful antioxidant activity of aqueous extract as the methanolic extract.

In parallel, exclusion chromatography demonstrated the presence of monophenols, intermediates and polyphenols in the aqueous extract. However, the methanolic extract contains only monophenols. Testing of these fractions on mice showed the toxicity of aqueous extract monophenols.

Keywords: White horehound, antioxidant activity, antimicrobial, toxicity, marrubiin.

Liste des abréviations

U.V	: Ultraviolet
EQ	: Equivalent de Quercitine
EAA	: Equivalent d'acide ascorbique
EAG	: Equivalent d'acide gallique
MS	: Matière sèche
EA	: Extrait aqueux
EM	: Extrait méthanolique
DO	: Densité optique
Poly EA	: Fraction des polyphénols d'extrait aqueux
Inte EA	: Fraction des intermédiaires d'extrait aqueux
Mono EA	: Fraction des monophénols d'extrait aqueux
Mono EM	: Fraction des monophénols d'extrait méthanolique
T	: Témoin négatif
S.C	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
C.T	: <i>Candida Tropicalis</i>
E.Coli	: <i>Escherchia Coli</i>
B.S	: <i>Bacillus Subtilis</i>

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Aspect morphologique de <i>Marrubium vulgare</i>	3
2	La <i>marrubine</i> présente dans le <i>marrube blanc</i>	4
3	Etapes de la préparation du <i>Marrube blanc</i>	10
4	Extraction par Soxhlet	11
5	Concentration croissante des extraits	12
6	Dosage des composés phénolique	13
7	Mécanisme de réaction de chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes	
8	Dosage des flavonoïdes	14
9	Pré culture des souches	16
10	Extrait aqueux et méthanolique	16
11	Activité antioxydante d'extrait aqueux et méthanolique	17
12	Fractions isolées par chromatographie d'exclusion d'extrait aqueux et méthanolique	19
13	Groupes des souris selon les fractions à tester	19
14	L'individu à disséquer de chaque lot	20
15	Rendement de l'extrait brut méthanolique et aqueux	19
16	Résultats de dosage des composés phénoliques	22
17	Résultats de dosage des flavonoïdes	22
18	CAT des deux extraits	24
19	A droite chromatographie d'extrait aqueux, à gauche l'absorbance de ces fractions	24
20	Fractions séparées par chromatographie d'exclusion d'extrait aqueux	25
21	Résultat de la chromatographie d'exclusion d'extrait méthanolique et l'absorbance de ces fractions	25
22	Fractions séparées chromatographie d'exclusion d'extrait méthanolique	26
23	Développement du poids des souris sous l'effet des fractions d'extrait aqueux	26
24	Développement du poids des souris sous l'effet des fractions d'extrait méthanolique	27
25	Variation du poids du foie selon les fractions testées	28
26	Variation du poids du cœur selon les fractions testées	28
27	Variation du poids des poumons selon les fractions testées	29
28	Résultats de la dissection	29

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Classe des composées phénoliques	7
2	CMI d'extrait aqueux	20
3	CMI d'extrait méthanolique	21
4	Résultats d'activité antifongique des extraits aqueux et méthanolique	21
5	Résultats d'activité antibactérienne des extraits aqueux et méthanolique	21

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
1. GENERALITES SUR LE <i>MARRUBE BLANC</i>	2
1.1. <i>Classification botanique : selon [APGIII] en 2009</i>	2
1.2. <i>Répartition géographique</i>	2
1.3. <i>Description morphologique</i>	3
1.4. <i>Composition chimique du marrube blanc</i>	3
1.5. <i>Utilisation traditionnelle du marrube</i>	4
1.7. <i>Toxicité</i>	5
2. COMPOSES PHENOLIQUES	5
3. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES PLANTES	7
3.1. <i>Activité antimicrobienne</i>	7
3.2. <i>Activité anti-oxydante</i>	8
1. MATERIEL VEGETAL	10
2. METHODES	10
2.1. <i>Préparation des extraits</i>	10
2.2. <i>Dosage de certains métabolites secondaires</i>	11
3. ACTIVITES BIOLOGIQUES	14
3.1. <i>Activité antimicrobienne</i>	14
3.2. <i>Activité anti-oxydante</i>	17
4. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION	18
5. TEST DE TOXICITE	18
1. RESULTATS DE L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE	19
1.1. <i>Préparation d'extraction</i>	19
1.2. <i>Evaluation de l'activité antimicrobienne</i>	20
1.3. <i>TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES ET EN FLAVONOÏDES</i>	22
1.4. <i>EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE</i>	23
2. EVALUATION DU TEST DE LA TOXICITE	24
2.1. <i>Analyse compositionnelle des extraits aqueux et méthanolique du Marrube blanc</i>	24
2.2. <i>Développement du poids</i>	26
CONCLUSION ET PERSPECTIVE	30
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	31

INTRODUCTION

A travers le temps, et en parallèle à l'évolution des moyens dans différents domaines, l'Homme a pu développer l'utilisation des plantes naturelles dans le domaine médicinal afin de guérir un grand nombre de pathologie, souvent mortelles.

En 2000, 15% des espèces végétales ont été étudiées sur le plan phytochimique parmi 300 000 espèces, dont 6% pour leur activité biologique (Verpoorte, 2002) ce qui montre encore la sous exploration effective des plantes médicinales. En 2015, 400 000 espèces sont décrites dont la grande majorité sont des plantes à fleurs (369 000 espèces) (Barthélémy) sachant que près de 2 000 nouvelles espèces sont découvertes chaque année. Dans le monde, 80% des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner et traiter certaines maladies (diabète, cancer, grippe, hypertension...) (Marrles et Farnsworth, 1995). Au Maroc grâce à ses contrastes géographiques, on estime qu'il présente plus de 4200 espèces et une végétation variée avec un endémisme très marqué. Les espèces à intérêt médicinal et aromatique sont estimées à environ 500 à 600 espèces (Verpoorte, 2002). Les plantes médicinales malgré leurs effets bénéfiques et thérapeutiques doivent être utilisées avec la plus grande prudence car elles peuvent parfois avoir des risques de toxicité (Fouché et al, 2000).

Le Marrube blanc (*Marrubium vulgare*) ou encore Mériouet (nom Marocain) est une plante qui appartient à la famille des lamiacées, et qui est très répandue dans la région méditerranéenne. Elle est très riche en tanins et en flavonoïde, grâce à ses composants elle est utilisée dans le traitement de plusieurs maladies ; le diabète (Fouché et al, 2000), les infections des voies respiratoires et les troubles de la sécrétion biliaire, les affections bronchiques aiguës bénignes et les rhumes (Sijelmassi, 2000).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail, dont le but principal est d'étudier les activités antimicrobiennes et anti-oxydantes de deux extraits de *Marrube blanc*, surtout que récemment le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques, a conduit à rechercher des substances naturelles à partir des plantes aromatiques dotées d'activité antimicrobienne et antioxydante.

Dans ce cadre, notre travail cible les objectifs suivants :

- ✓ Quantification des extraits du Marrube blanc en composés phénoliques et en flavonoïdes et l'évaluation de leurs activités antimicrobiennes et antioxydantes.
- ✓ Séparation des différentes fractions des composés phénoliques par chromatographie d'exclusion.
- ✓ Evaluation de la toxicité des fractions séparées sur un modèle animal.

Première partie :

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur le *Marrube blanc*

Le Marrube blanc est une plante aromatique et médicinale qui possède des propriétés médicamenteuses (Abdul Razzaq et El Sayed haykle, 1993). La partie utilisée de cette plante est sous forme du principe actif, des huiles, des extraits aqueux ou organiques (Ahmed Faraj Atiyat, 1995). En fait il s'agit d'une plante utilisée pour se protéger contre, soigner ou soulager divers maux.

1.1. Classification botanique : selon [APGIII] en 2009

Règne :	Végétal
Sous-règne :	Plante vasculaire
Embranchement :	Spermatophytes
Division :	Magnoliophytes
Classe :	Magnoliopsides
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiacées
Genre :	Marrubium
Espèce :	<i>Marrubium Vulgare</i>

Nom vernaculaire :

Français : Marrube blanc, marrube commun (Schauenberg et Paris, 2005).

Anglais : Horehound (Schauenberg et Paris, 2005)

Arabe : Badhaouer (Baba Aissa, 1991).

Berbère : Mériouet (Baba Aissa, 1991).

1.2. Répartition géographique

Le Marrube blanc (*Marrubium vulgare*) est une plante herbacée vivace qui pousse dans toute l'Afrique du nord et presque dans toute l'Europe (Verpoorte, 2002 ; Marles et Farnsworth, 1996, Fouché et *al.*, 2000), aussi le centre, le sud-ouest de l'Asie et l'Amérique du nord (Verpoorte, 2002). On la trouve dans des prés secs, des lieux incultes, des décombres, des terrains vagues et sur les bords des chemins.

1.3. Description morphologique

Le Marrube blanc est une plante qui se distingue par une odeur forte de thym, une couleur grisonnante et une légère ressemblance avec la menthe. Elle peut atteindre 25 à 45 cm de hauteur, ces fleurs sont blanches et petites, apparaissent généralement du mois de Mai jusqu'au mois de septembre, et parfois encore en hiver. Le Marrube blanc est muni d'un calice à 10 dents, dont les 5 commissurales plus courtes, toutes terminées en pointes épineuses. Cette plante vivace présente des tiges épaisses, cotonneuses, très feuillées qui se multiplient par bourgeons nés sur la tige souterraine (Figure 1).



Figure 1 : Aspect morphologique du *Marrubium vulgare*

1.4. Composition chimique du marrube blanc

La partie aérienne du marrube blanc contient plusieurs métabolites secondaires tels que les diterpènes dont la marrubine responsable de la majorité des propriétés biologiques de *Marrube blanc* (Price L et Price S, 2004), les flavonoïdes (apigénine et lutéoline) (Bnouham et al, 2006), ainsi que plusieurs phényl propanoïdes esters tels que les verbascosides (Paolini J et al, 2008). Il y a également des Hétérosides flavoniques du quercétol, de la lurtéoline ou de l'apigénine, mais aussi des lactoylflavones, et quelques dérivés de l'acide ursolique. En outre il y a des tanins spécifiques des Lamiacées et dérivés de l'acide hydroxy cinnamique (Juste à 7%) (Acide chlorogénique, caféique, caféylquinique, mais absence d'acide rosmarinique).

Toutefois la présence d'une faible quantité d'huiles essentielles comportant différents composés monoterpéniques (moins de 1% : α -pinène, camphène, lomonène) (Wichtlet Anton, 2003).

A côté de ces constituants, *Marrube blanc* possède aussi d'autres principes actifs, tels que les acides phénoliques, matière pectique et autres comme les sels minéraux, huile essentielle qui est constituée essentiellement de caryophyllène, de trans-caryophyllène, de germacrène-D, de bicyclogermacrène et de trans-anéthol (Valnet, 1992).

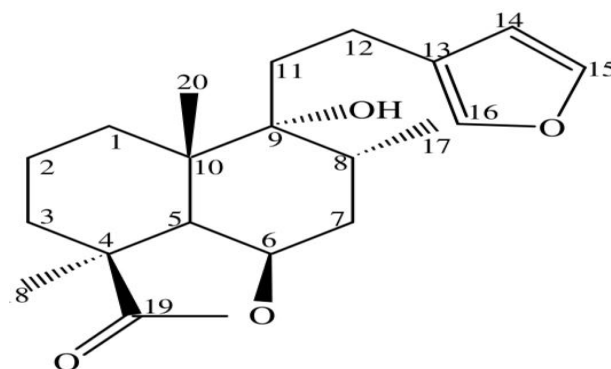


Figure 2 : La marrubine présente dans le Marrube blanc

1.5. Utilisation traditionnelle du marrube

Le marrube blanc est prescrit dans le traitement des difficultés respiratoires, des bronchites, des bronchectasies, des bronchites asthmatiformes des toux sèches, la fluidification des mucosités et de la coqueluche. La décoction est employée comme antidiabétique (Bellakhdar, 1997). Le *Marrube blanc* est indiqué pour les dermatoses, eczéma chronique, hystérie (Valnet, 1983). La richesse de marrube blanc en composés phénoliques, en flavonoïdes ... lui permet d'identifier une activité anti-oxydante importante. L'infusion chaude aide à faire tomber la fièvre, lorsque la quinine est inefficace, elle est proposée contre la malaria. (Chiej, 1982). Selon la commission allemande, elle est utilisée dans le traitement des dyspepsies et la perte d'appétit.

1.6. Contre-indications et effets indésirables

Selon les résultats d'essais sur les lapins, le marrube aurait une action hypoglycémiante. On recommande donc la prudence dans le cas de diabétiques sous médication (Weel, 1999). Ainsi on recommande généralement aux femmes enceintes d'éviter le marrube parce qu'il stimulerait l'utérus et pourrait avoir une action abortive (Weel, 1999). Les vertus curatives de l'espèce *Marrube blanc* sont sans doute liées à l'existence de certaines substances chimiques dans la totalité de la plante.

1.7. Toxicité

Les plantes contiennent des mélanges complexes de terpènes, alcaloïdes des saponines et d'autres substances chimiques. Ce qui augmente le risque de réactions indésirables par leurs effets additifs ou synergiques des interactions chimiques (Trevoux et al, 2000). La toxicité et l'effet bénéfique d'une plante sont généralement dose dépendante. Le marrube blanc est une plante amère à caractère salin et ne peut donc pas être tolérée s'il y a une gastroentérite ou des situations de nausées ou de vomissements ou encore en cas de dyspepsie (Aouadhi, 2010).

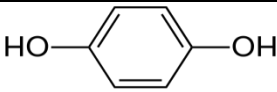
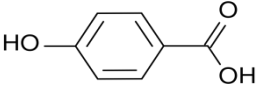
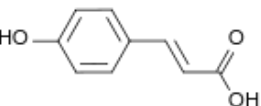
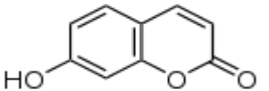
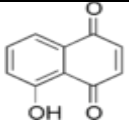
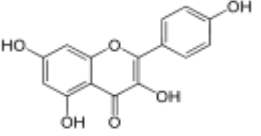
2. Composés phénoliques

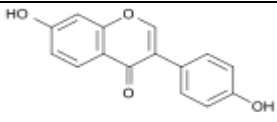
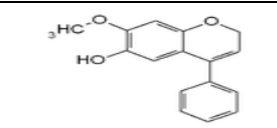
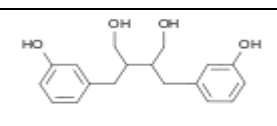
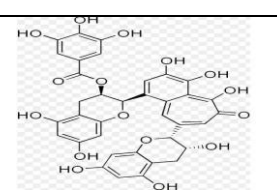
Les composés phénoliques sont caractérisés par un groupement phénol ; ils sont le plus souvent solubles dans l'eau et présents sous forme glycoconjugué. Les formes les plus simples sont représentées par deux principaux groupes dont dérivent de nombreux composés : les acides hydroxy cinnamiques et les flavonoïdes, ces derniers sont des composés en C6-C3-C6, qui renferment plusieurs milliers de molécules pouvant être regroupées en plus de dix classes, induisant une nomenclature complexe. Ces composés constituent un groupe important de métabolites secondaires, environ 10 000 composés ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques la tyrosine et surtout de la phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façon variable suivant les végétaux, (Guignard, 2000). Au niveau de la cellule, ces polyphénols sont répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales (Winkel, 2001). Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons (Winkel, 2001 ; Macheix *et al*, 2005). D'autres organites du cytoplasme, comme des vésicules golgiennes ou des chloroplastes, peuvent participer à la biosynthèse des composés phénoliques mais ce ne sont pas des lieux d'accumulation (Macheix *et al*, 2005). Les composés phénoliques interviennent dans des nombreux processus physiologiques de la plante et dans les interactions avec leur environnement.

❖ Flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ces composés peuvent avoir un rôle de signal (Treutter, 1997) et permettent par exemple la mise en place de la symbiose entre des Fabacées et des bactéries, ce qui permet à ces plantes de fixer directement l'azote atmosphérique. Ils participent aux phénomènes de pollinisation puisqu'ils sont responsables de la coloration des fleurs (Macheix *et al*, 2005). En plus les flavonoïdes ont un rôle de filtre contre le rayonnement UV, ce qui détermine leur localisation dans les tissus externes (Gould et Lister, 2005). Enfin les flavonoïdes comme les dérivées hydroxy cinnamiques jouent un rôle important dans la résistance des plantes aux stress environnementaux (Walton et Brown, 1999). Lors de blessures ou d'attaques de pathogènes fongiques et bactériens, la synthèse de composés phénoliques est stimulée (induite). Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont : flavones, isoflavandiol, flavanol, flavondiol, auron, chalcone, anthocyanine (Efendi *et al*, 2008).

Tableau1 : Classes des composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Exemple	Structure
C ₆	Phénols simples	Hydroquinine	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	Acides parahydroxybenzoïques	
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	Acide paracoumarique	
	Coumarines	Ombelliférone	
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglon	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Flavonoides	Kaempférol	

	Isoflavonoides	Daidzéine	
	Anthocyanes	Dalphinol	
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	Entérodol	
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins condensée	Procyanidine	

3. Activités biologiques des plantes

Plusieurs études ont montré que la présence des composés chimiques dans les plantes, lui permettent d'être utiliser pour des activités biologiques ; activité antimicrobienne et activité anti-oxydante.

3.1. Activité antimicrobienne

Récemment, plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leur pouvoir antibactérien, antifongique. La principale cible des composés naturels des plantes médicinales est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. Les huiles essentielles, flavonoïdes, alcaloïdes voir même les tanins pourraient induire une fuite d'ions au niveau de la membrane et par voie de conséquences des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité aux ions tels que le potassium est un effet précurseur de leur mort (Rhayour, 2002). La 1^{ère} mise en évidence de l'action des extraits des plantes médicinales contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix. Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont des phénols (thymol, carvacrol) des alcools, (α -terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), des aldéhydes, des cétones et plus rarement des terpènes (Dorman et Deans, 2000). Les extraits des plantes médicinales agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positives que sur les bactéries à Gram négatives. Toutefois, les bactéries à Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure

de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). Les phénols ont des fonctions anti-infectieuses, antibactériennes et antifongiques, Ils ont à la fois une propriété antiseptique et désinfectante, ainsi que des propriétés antiparasitaires. Ils se révèlent également comme ayant des propriétés stimulantes, antivirales et immunisantes. Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus l'extrait ou l'huile essentielle est efficace (Cosentino et al, 1999). Cependant, les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité ; la totalité de la composition chimique doit être prise en compte (Cosentino et al, 1999).

3.2. Activité anti-oxydante

3.2.1. Radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Ce sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui, avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. Ils sont produits dans toutes les cellules de l'organisme tout à fait normalement et en faible quantité dans les mitochondries. Il s'agit des ions oxygène, hydroxyde et de l'eau oxygénée qui sont libérés lors des réactions biochimiques. Avant d'être neutralisés ils provoquent des lésions sur tous les éléments qu'ils contiennent.

3.1.2. Antioxydants

Un antioxydant est toutes substances qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substances biologiques, ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et le rendent aussi inoffensifs (Vansant, 2004). L'organisme sait cependant se défendre contre les radicaux libres, grâce aux enzymes antioxydants contenues dans nos cellules. Ces enzymes sont aidées dans leur action antiradicalaire par la vitamine E, C, provitamine A, le zinc et le sélénium (Boss, 2002). L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes (Ekoumou, 2003). En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition. Les principales formes de l'oxygène qui provoquent ces troubles sont : l'oxygène O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les peroxydes alkyles $ROOH$, le radical superoxyde O_2^- les radicaux hydroxyles OH , peroxydes ROO et alkoxydes RO (Cavin, 1999). Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines (Ahamet, 2003).

Deuxième partie :

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

Les plantes sujet d'études sont récupérées à partir de la ville de Fès chez les herboristes et séchées à l'air libre. Les parties aériennes sont rassemblées et réduites en poudre (Figure 3) qui va servir ensuite à la préparation des extraits et à la quantification des flavonoïdes et les composés phénoliques puis à l'évaluation de l'activité antimicrobienne, anti-oxydante et la toxicité des fractions séparées par chromatographie d'exclusion sur les souris.



Figures 3 : Préparation du marrube blanc (1: Séchage ; 2: Réduction en poudre ; 3: Poudre)

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits

Deux extraits ont été préparé, l'extrait aqueux ; par 20g de poudre et 200 ml d'eau distillée et l'extrait méthanolique ; par 20g de poudre et 200ml de méthanol. On utilise le Soxhlet comme extracteur (Figure 4) ensuite l'extrait aqueux et le reste du méthanol d'extrait méthanolique ont

été évaporés à sec à l'étuve à 45°C. Après l'évaporation l'extrait est récupéré, puis pesé pour déterminer le rendement selon la formule suivante :

$$\text{Rdt} = (\text{Mext} / \text{Mécha}) * 100$$

Avec :

Rdt : Rendement en %

Mext : Masse d'extrait après évaporation en g

Méch : Masse de la poudre en g



Figure 4: Montage d'extraction par Soxhlet. à gauche l'extraction méthanolique, à droite l'extraction aqueuse

2.2. Dosage de certains métabolites secondaires

Pour quantifier la teneur en composés phénoliques, en flavonoïdes et étudier l'activité antioxydante on a préparé nos extraits (aqueux et méthanolique) comme suit : A partir de chaque extrait on a pesé 50, 100, 200mg et on l'a solubilisée dans 10ml du solvant d'extraction (Figure 5). Après des tests préliminaires nous avons constaté que la concentration 5mg/ml qui nous à donner des bons résultats.



Figure 5: Concentrations croissantes des extraits

2.2.1. Quantification des composés phénoliques

❖ Principe

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Le mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue est proportionnelle au taux des composés phénoliques (Ribereau-Gayonet *al*, 1982).

❖ Mode opératoire

Une quantité de 1ml de l'extrait est mélangée avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (10fois dilué) et 1ml de carbonate de sodium à 5% (Na_2CO_3). Le mélange est agité et placé à l'obscurité pendant 40min. Ensuite les composés phénoliques totaux sont déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. On prépare dans les mêmes conditions un témoin négatif en utilisant l'eau distillée à la place de l'extrait. La détermination de la concentration des composés phénolique dans les extraits est faite selon une gamme-étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique (0 à 3 mg/ml). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait sec (Figure 6).



Figure 6 : Dosage des composés phénoliques

2.2.2. Quantification des flavonoïdes

❖ Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Zhishen *et al*, (1999) avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose. L'absorbance est visible à 510 nm.

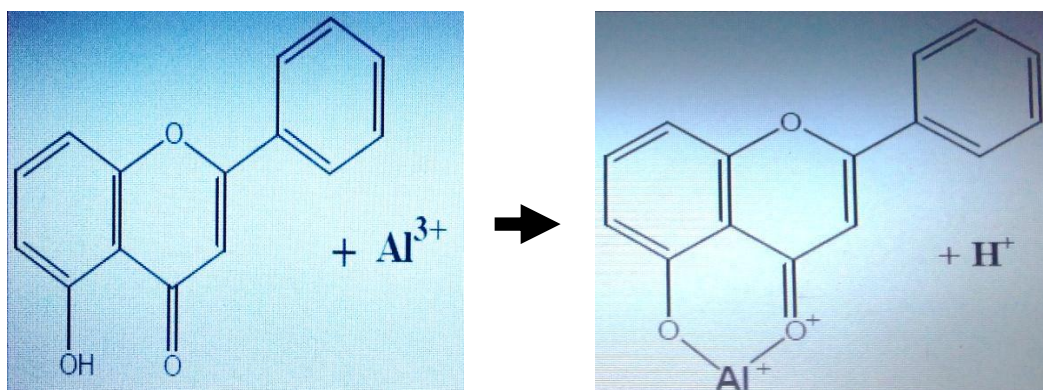


Figure7 : Mécanisme de réaction de chlorure d'Aluminium avec les flavonoïdes

❖ Mode opératoire

1 ml d'extrait est mélangé de 0,3ml de NaNO₂ (5%), après 5min on ajoute 0,3ml de AlCl₃, après 6min on ajoute 2ml de NaOH et 7,4 d'eau distillée, le témoin est préparé en parallèle. L'ensemble est incubé dans l'obscurité pendant 30min et a été lue à 510 nm. La concentration des flavonoïdes dans l'extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la

quercitrine à différentes concentrations (10, 20, 40, 60, 80, 100µg/ml) préparées dans les mêmes conditions opératoires que l'extrait qui servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en microgrammes équivalents de quercitrine par milligrammes du poids d'extrait sec (µg EQ/mg MS) (Figure8).

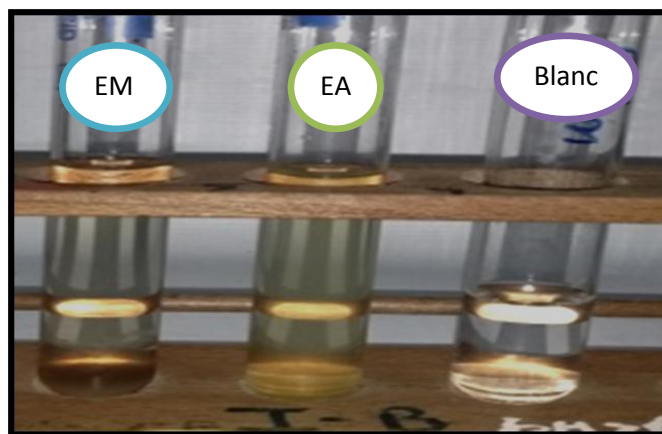


Figure 8 : Dosage des Flavonoïdes
(EM :extrait méthanolique, EA : extrait aqueux)

3. Activités biologiques

3.1. Activité antimicrobienne

3.1.1. Préparation de culture

Pour étudier l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux et de l'extrait méthanolique on a préparé deux milieux de culture différents :

- ✓ Milieux LB et YPG solide et liquide

Le milieu LB ou 'Lysogeny broth' est un milieu nutritif utilisé spécifiquement pour la culture bactérienne. Pour le milieu YPG "Yeast extract Peptone-Glucose-Agar" ou également YGC est utilisé pour la culture des levures 250ml de chaque milieu LB et YPG solide ont été préparés, et 100ml pour les milieux liquides (Annexe1).

3.1.2. Souches étudiées

L'activité antimicrobienne est réalisée sur 4 souches: 2 bactéries : *Escherichia Coli* et *Bacillus subtilis* et 2 levures : *Candida tropicalis* et *Saccharomyces cerevisiae*.

• *Escherichia Coli*

Escherichia coli est un bacille à gram négatif (Patrick *et al*, 1988), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm (Steven *et al*, 2004). *E. coli* constitue la majeure partie de la flore microbienne du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies (Patrick *et al*, 1988).

• *Bacillus subtilis*

Bactérie à gram positif, sporulante, aérobie et anaérobie facultative. La spore de *Bacillus subtilis* lui permet de survivre des années dans la terre en attendant l'occasion d'infecter un nouvel hôte.

• *Candida tropicalis*

Levures de forme variable rondes à allongées, fréquemment isolées dans la nature, du sol, de végétaux, de l'eau. Il provoque chez l'homme des infections superficielles cutanéomuqueuses, des onyxis ainsi que des infections profondes : pulmonaires, urinaires et septicémiques.

• *Saccharomyces cerevisiae*

Levures sous forme de cellules isolées, ovoïdes à arrondies, de 5 à 10 µm de diamètre. Elle peut vivre dans l'air ou fermenter, c'est-à-dire transformer le sucre en alcool.

Chaque souche est ensemencée dans une nouvelle boîte de pétri pour assumer leur viabilité, après elle est incubée 24 h à 37°C dans le milieu solide convenable (LB ou YPG). Après cette incubation les souches sont pré-cultivées à nouveau dans le milieu liquide et incubées 12 h (Figure9).



Figur9: Pré-culture des souches

Après 6 heures d'incubation de la souche l'extrait (méthanolique et aqueux) est préparé comme suit : 0,1g d'extrait dans 10 ml du solvant d'extraction (l'eau distillé ou méthanol) (Figure10), à partir de cette solution nous avons réalisés une série de concentrations croissantes de 0, 5, 10,15 et 20 μ l.

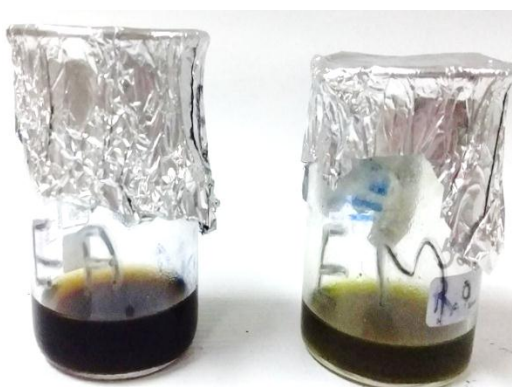


Figure10 : Extrait aqueux (à droite), extrait méthanolique (à gauche)

En parallèle une série de dilution en cascade de la souche est effectuée par les volumes suivants 900 μ l de l'eau physiologique et 100 μ l de la souche. Ensuite nous avons ajoutés 10 μ l de l'extrait aux dilutions préparées (à partir de 10^{-5} pour les bactéries et de 10^{-4} pour les levures) et puis incubées 6h à 37°C. Après l'incubation, 100 μ l de chaque concentration est étalée sur la boîte de pétri et incubé à nouveau à l'étuve pendant 24h à 37°C. Après 24h les résultats seront déterminés.

3.2. Activité anti-oxydante

❖ Principe

Afin de détecter l'activité anti-oxydante des extraits aqueux et méthanolique de Marrube blanc, en se basant sur le test de phosphomolybdate qui est appuyé sur la réduction du molybdène. Cette réduction se caractérise par la formation d'un complexe verdâtre.

❖ Mode opératoire

La méthode consiste à introduire dans des tubes à essai 0,3ml de chaque extrait (de deux dilutions 1/5 et 1/7) avec 3ml d'un réactif composé de l'acide sulfurique H_2SO_4 , de sodium hydrogène phospho-2-hydrate (NaH_2PO_4) et du molybdate d'ammonium. Après homogénéisation par le vortex, les tubes sont bien fermés puis incubé à $95^{\circ}C$ pendant 90min. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 695 nm (Prieto et al, 1999). Le témoin est préparé également et se compose de 0,3ml de l'eau distillé mélangé avec 3ml de réactif mentionné ci-dessus. Les étalons, les échantillons et le témoin sont incubés dans les mêmes conditions de températures. La gamme d'étalonnage a été obtenue à partir des solutions d'acide ascorbique (Vitamine C) de concentration massique allant de 0,25 jusqu'à 1. Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent Vitamine C par ml (Figure 11).

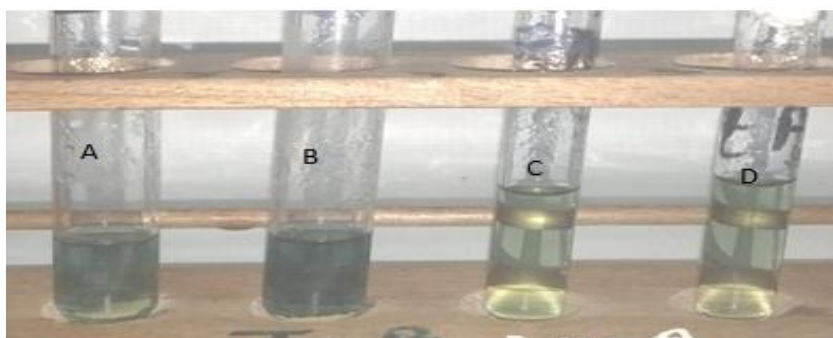


Figure 11 : Activité anti-oxydante d'extrait aqueux et méthanolique

(A : dilution de 1/5 d'EM ; B : dilution de 1/7 d'EM ; C : dilution de 1/7 d'EA ; D : dilution de 1/5 d'EA)

4. Chromatographie d'exclusion

❖ Principe

La chromatographie d'exclusion ou filtration sur Gel ou tamisage moléculaire est une méthode de séparation a pour but de purifier ou de caractériser les composés d'un mélange selon le volume qu'occupe la molécule. On utilise une colonne contenant un gel poreux (Séphadex G50), ce dernier retiendra plus facilement les grosses molécules que les petites.

❖ Mode opératoire

On a préparé 0,3g d'extrait dans 1ml d'eau distillée et on la faire couler dans la colonne sur gel e Séphadex G50. Puis on suit la séparation des différentes fractions (polyphénols, intermédiaires et monophénols) tout en récupérant ces fractions dans des petits tubes afin de lire l'absorbance par spectrophotomètre à 509 et à 380 nm.

5. Test de toxicité

❖ Principe

Le principe de cette activité est de suivre le poids et le comportement des souris pendant toute la période d'expérience afin de réaliser une dissection à la fin pour déterminer l'état des différents organes interne.

❖ Mode opératoire

On a fait rassembler les différentes fractions obtenues par la chromatographie (monophénols, polyphénols, intermédiaire d'extrait aqueux et les monophénols d'extrait méthanolique). 0.2ml de chaque fraction a été ajouté dans 50ml de l'eau des souris Figure 12 et 13.

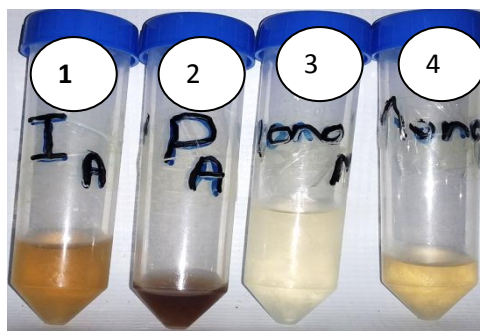


Figure 12 : Fractions des extraits aqueux et méthanolique
 (1 : intermédiaire, 2:polyphénols, 4:monophénols) d'extrait aqueux ;3: monophénols d'extrait méthanolique.



Figure 13: Groupes des souris selon les fractions testées

Après 15 jours d'expériences une souris de chaque lot à condition d'être de même poids a été disséquée après une anesthésie par l'éther, afin d'isoler le foie, les poumons et le cœur et de vérifier l'état (leurs couleur, aspect...) de chacune et leurs poids par rapport au témoin Figure 14.



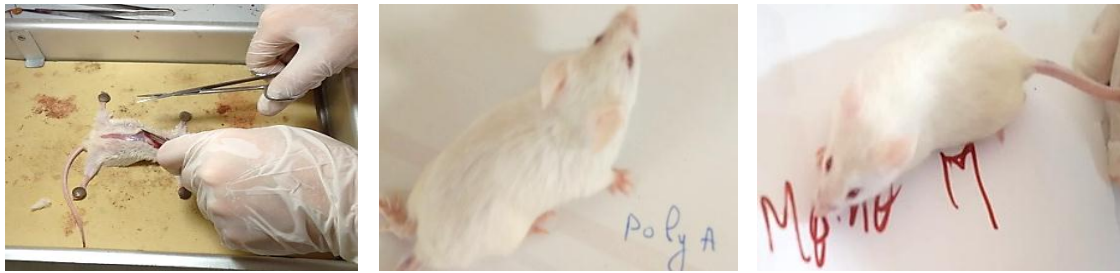


Figure14 : L'individu à disséquer de chaque lot

Troisième partie:

Résultats et discussion

1. Résultats de l'étude phytochimique

1.1. Préparation d'extraction

❖ Extrait aqueux et méthanolique

Chaque extrait a été caractérisé par son rendement, son aspect et sa couleur par rapport à la poudre sèche. Ces éléments sont présentés dans la Figure 15.

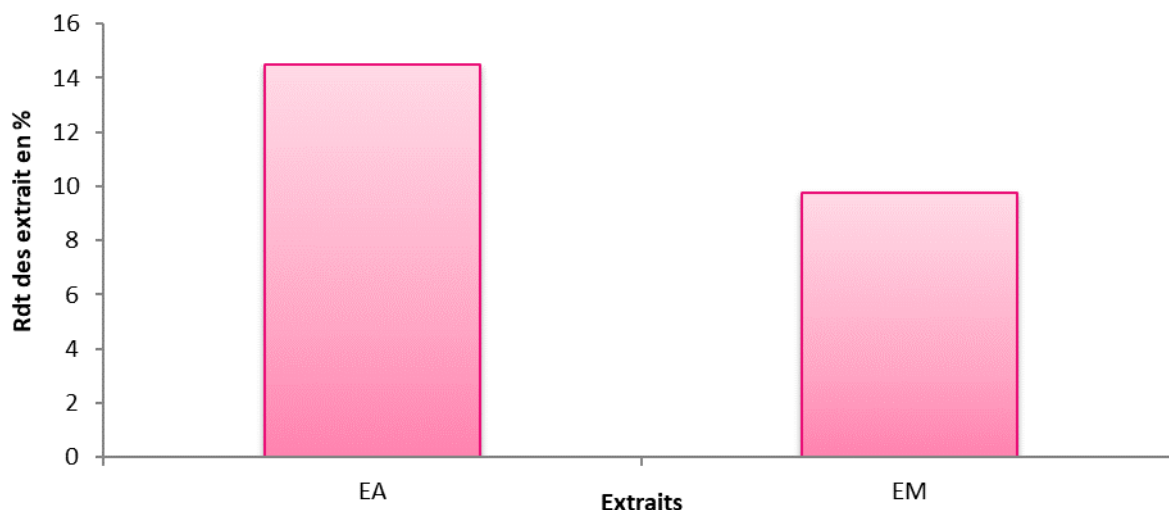


Figure 15 : Rendement d'extrait méthanolique et d'extrait aqueux (EA : extrait aqueux ; EM : extrait méthanolique)

D'après cette figure (15) nous avons remarqué que le rendement le plus élevé a été observé au niveau de l'extrait aqueux (14.50%). Par contre, l'extrait méthanolique présente le rendement le plus faible avec (9.55%). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs, plus récemment Nabil GHEDADBA(2014) et son groupe ont montré que l'extrait aqueux donne la valeur la plus élevée (12.98%), suivi par l'extrait méthanolique qui a donné un rendement de (10.9%). Cependant, l'extraction à l'éther de pétrole, qui a pour but de délipider la matière végétale, a conduit à un rendement faible de 2,1 %. Ils ont démontré que les solvants polaires donnent des rendements meilleurs que les solvants apolaires, étant donné que les solvants polaires ont la capacité de diffuser à l'intérieur de la poudre végétale, d'atteindre la matrice végétale et de récupérer par conséquent le plus possible des métabolites. Tandis que les solvants apolaires, non miscibles avec l'eau, n'ont pas la capacité d'extraire le maximum des molécules bioactives à cause de la présence de l'eau contenue dans le tissu végétal. En revanche, une étude faite par Al-Bakri et Afifi en 2007 a montré que l'extrait méthanolique présente un rendement plus élevé (20%) que notre étude. Ces variations dans le rendement d'extraction varient selon la nature du solvant, la méthode d'extraction utilisée, la période, le lieu de la récolte et la durée de séchage.

1.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

❖ Détermination de la CMI

Les résultats obtenus de la CMI sont présentés sur les tableaux 2, 3, 4 et 5. D'après les résultats obtenus nous avons remarqué que la CMI de l'extrait Méthanolique a été observée contre *C.T* et *B.S* au niveau de la concentration 0.05 mg/ml, puis contre *S.C* au niveau de la concentration 0.1mg /ml. Pour l'extrait aqueux, la concentration 0.05 mg/ml a inhibé *C.T* et *S.C*.

D'après les tableaux 2, 3,4 et 5 on ressort que les levures présentent une sensibilité vis à vis les deux extraits du marrube blanc, alors *qu'E. Coli* est plutôt résistant. Par contre *B.S* est résistante en cas d'extrait aqueux et sensible en cas de l'extrait méthanolique. D'après nos résultats, les extraits aqueux et méthanolique exercent un effet antimicrobien important sur les levures, en plus l'extrait méthanolique a un effet contre *B.S* que l'extrait aqueux ne l'exerce pas. En revanche un effet très faible ou absent contre *E. Coli* pour les deux extraits. Ces résultats sont en accord avec une étude déjà faite par Mubashir et ses collaborateurs en 2009 a montré que l'extrait aqueux des feuilles de l'espèce *marrube blanc* exerce une forte activité inhibitrice sur les souches *staphylococcus aureus* MTCC 740, *Staphylococcus epirmidis* MTCC 435 et une activité de degré moindre sur *Proteus vulgaris* MTCC 426 et *E. Coli* MTCC 443. Ce groupe de recherche lui-même en 2008 a montré que l'extrait méthanolique brut du marrube blanc est très efficace contre *B.S*, modérément efficace contre *P. vulgaris* et *E.Coli* et inefficace totalement contre *P. aeruginosa*. Zahra DEHBASHI et ses collaborateurs en 2015 ont réalisé une étude qui est en accord avec nos résultats et ont montré que l'extrait méthanolique a un pouvoir antimicrobien très important contre *B.S*, *S. epidermidis*, *S. aureus* (Gr+) et *C. albicans* et de moindres degrés ou même absent contre *P. vulgaris* et *E. coli*.

Tableau 2 : CMI d'extrait aqueux

Concentration en mg /ml/souche	0	0.005	0.01	0.015	0.02
E.Coli	+	+	+	+	+
BS	+	+	+	+	+
CT	+	-	-	-	-
SC	+	-	-	-	-

+ : Présence des colonies

- : Absence des colonies

Tableau 3 : CMI d'extrait méthanolique

Concentration en mg /ml/souche	0	0.005	0.01	0.015	0.02
E.Coli	+	+	+	+	+
BS	+	-	-	-	-
CT	+	-	-	-	-
SC	+	+	-	-	-

+ : Présence des colonies

- : Absence des colonies

Tableau4 : Résultats d'activité antibactérienne des extraits aqueux et méthanolique

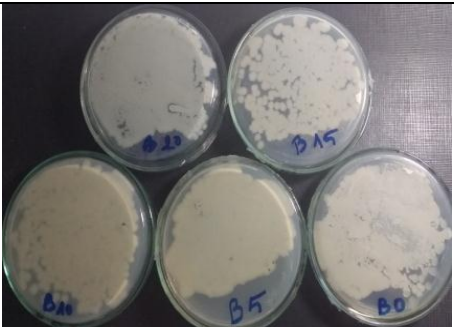
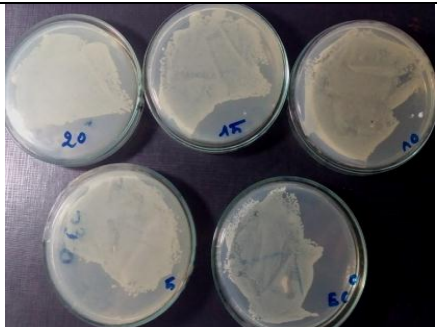
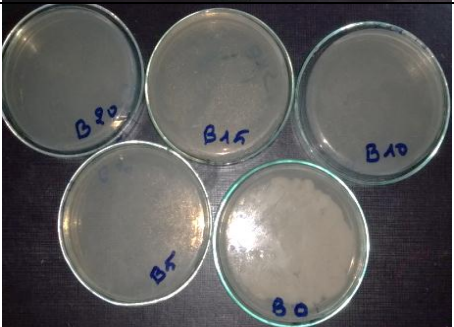
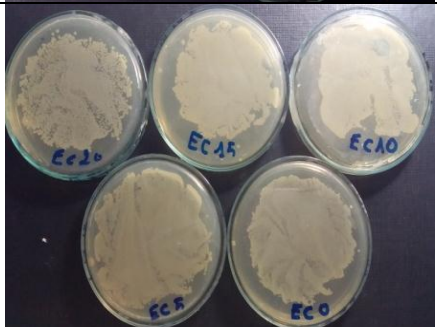
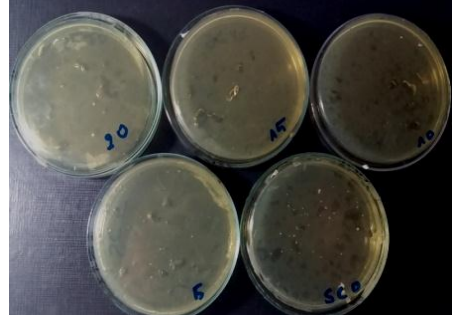
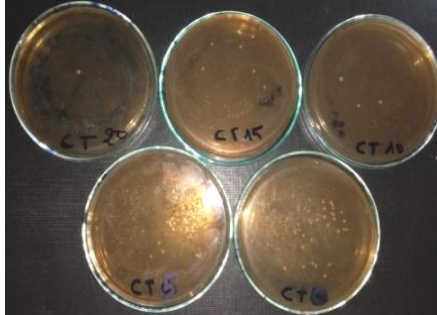
Extrait /souche	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>E.Coli</i>
Extrait aqueux		
Extrait méthanolique		

Tableau5 : Résultats d'activité antifongique des extraits aqueux et méthanolique

Extrait /Souche	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Extrait aqueux		



1.3. Teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes

Les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes dans les deux extraits du marrube blanc sont représentés dans les figures 16 et 17. Les concentrations ont été rapporté en mg EAG / mg d'MS (ANNEXE 2). Les résultats montrent que l'extrait aqueux a une forte teneur en composés phénoliques (0.5293 ± 0.00039) par rapport à l'extrait méthanolique (0.3246 ± 0.00039).

La teneur en flavonoïdes pour chaque extrait a été rapportée en mg EQ/mg d'MS (ANNEXE 3). Les résultats révèlent que les deux extraits présentent des teneurs modérées, on peut déduire que les flavonoïdes représentent (8.76%) des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique. Ce taux ne dépasse pas (5.40%) dans l'extrait aqueux (figure15).

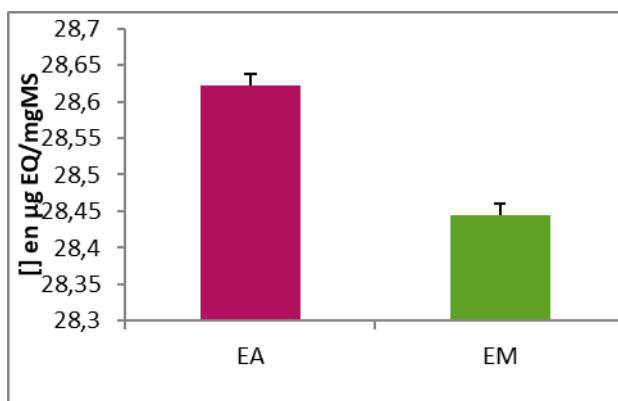


Figure16: Teneur en flavonoïdes d'extrait aqueux et d'extrait méthanolique

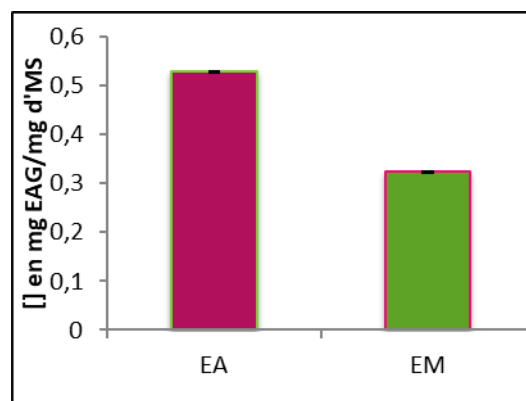


Figure 17 : Teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits aqueux et méthanolique

Notre résultat est en désaccord avec une étude qui a été faite par Nabil GHEDADBA et ses collaborateurs de travail (2014) et qui ont montré que l'extrait méthanolique présente une teneur en composés phénoliques (195 ± 0.36 mg EAG/100g d'extrait sec) plus élevée que l'extrait aqueux (155 ± 0.36 mg EAG/100g d'extrait sec). Mais ce résultat reste approximativement très proche par rapport aux résultats obtenus par d'autre solvant d'extraction, étherique ($<50 \pm 0.36$ mg EAG/100g de MS) et butanolique ($<150 \pm 0.36$ mg EAG/100g de MS). Cette étude a montré que la

concentration en flavonoïdes dans l'extrait méthanolique est de 33.10 ± 0.60 mg EQ/100mg du matériel végétal, suivie par l'extrait aqueux lyophilisé (23.86 ± 0.36 mg EQ/100g du MS et puis butanolique (20.90 ± 0.78 mg EQ/100g ES). La plus faible concentration a été observé pour l'extrait étheré (3.15 ± 0.17 mg EQ/100g ES). Ces résultats obtenus pour ce groupe de recherche ont été approuvé par la solubilité élevée des phénols et des flavonoïdes dans les solvants polaires (méthanol et l'eau distillée) et la moindre solubilité dans les solvants apolaires (butanol, éther). Ce désaccord dans les résultats est dû probablement à la méthode d'extraction dans ce cas ils ont utilisé une macération pour l'extrait aqueux et une extraction par reflux pour les autres solvants en plus des conditions de récolte de la plante, du séchage et d'évaporation des extraits. D'autre étude en accord avec nos résultats d'extrait méthanolique a été faite par Ch. Aouadhi et al (2014) ont montré que la teneur en phénols dans l'extrait méthanolique est plus élevée que la teneur en flavonoïdes. La teneur a été de 26.8 ± 0.01 mg EAG/g MS. Tandis que la teneur en flavonoïdes ne dépasse pas 0.61 ± 0.05 mg Catéchine/ml. Ce résultat confirme que les feuilles du marrube blanc sont riches en composés phénoliques que les flavonoïdes.

1.4. Evaluation de l'activité anti-oxydante

Le test de phosphomolybdate ou la capacité anti-oxydante totale des extraits étudiés exprimée en nombre d'EAA (ANNEXE 4) est présenté dans les figures 17 et 18. D'après les résultats obtenus, l'estimation de la capacité antioxydante totale des extraits a montré une variabilité en fonction de la nature du solvant (méthanolique et aqueux). Nous avons remarqué au niveau de la concentration 5mg/ml, que l'extrait aqueux a une forte capacité antioxydante totale que l'extrait méthanolique. Alors le pouvoir antioxydant observé dans les trois extraits pourrait être dû essentiellement à la richesse des extraits en polyphénols particulièrement les flavonoïdes et aussi en fonction des structures chimiques des molécules bioactives.

Les résultats de Boudjelal (2012), obtenus à partir de l'extrait méthanolique de la partie Aérienne de *Marrubium vulgare* a montré une activité anti-oxydante élevée avec une valeur de 0.49 mg/ml. Contrairement, les travaux réalisés par Orhan et al, 2010, affirment que l'extrait méthanolique est moins actif que l'extrait acétonique de la même espèce.

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

mg/ml de l'extrait brut méthanolique d'une autre espèce de *Marrubium* (*Marrubium peregrinum*) a été retrouvé à partir du piégeage du DPPH lors des travaux réalisés par Milan (2011).

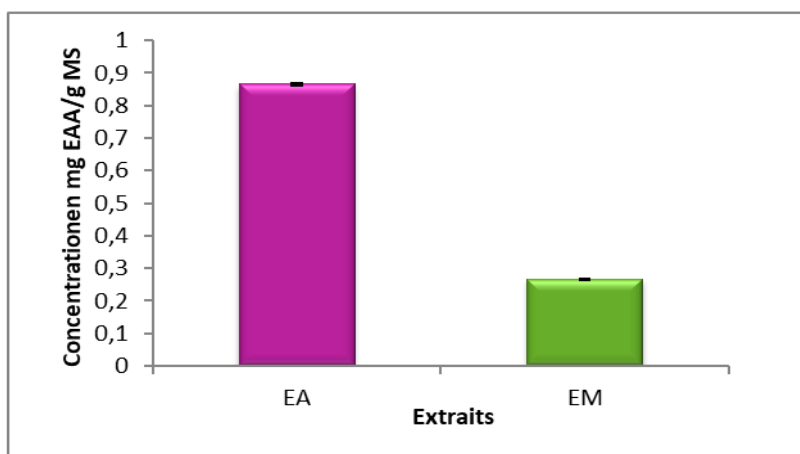


Figure18 : Capacité anti-oxydante totale des deux extraits testés. Les barres correspondent au ES pour $n = 3$

2. Evaluation du test de la toxicité

2.1. Analyse compositionnelle des extraits aqueux et méthanolique du Marrube blanc

Expérimentalement la chromatographie d'exclusion d'extrait aqueux de Marrube blanc peut être divisée en trois parties différentes selon la couleur des fractions : la première de 3.5 à 5.5 minutes où les polyphénols élucident (du 8^{ème} tube à 12^{ème}), puis la deuxième de 5.5 à 9 l'intervalle entre 9 et 12.5 minute les monophénols élucident (de 21^{ème} tube à 27^{ème}).

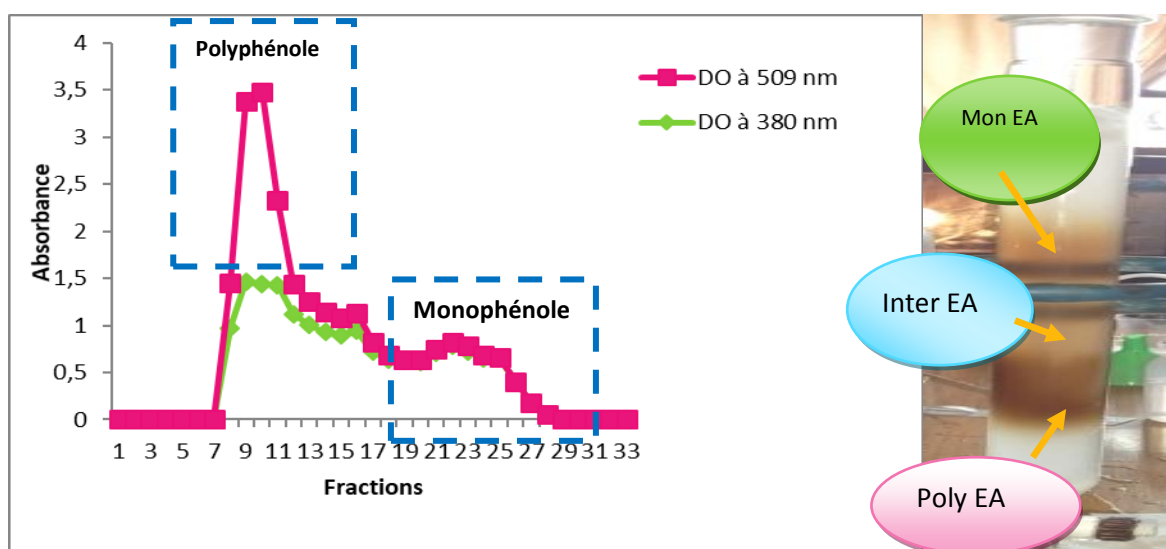


Figure19 : A droite chromatographie d'extrait aqueux, à gauche l'absorbance de ces fractions.

D'après les résultats de la figure 19 on peut confirmer réellement que l'extrait aqueux est composé de 3 types de groupes des molécules qui correspondent à 3 pics principaux dans la courbe de DO à 380nm. En premier les polyphénols suivies des intermédiaires et le 3^{ème} pic correspond aux monophénols. Parallèlement au premier pic à 380nm un maximum pic est observé pour l'absorbance à 509. Ce résultat obtenu confirme que la molécule de la marrubine est comptée parmi les polyphénols du marrube blanc.



Figure20 : Fractions séparées par chromatographie d'exclusion d'extrait aqueux

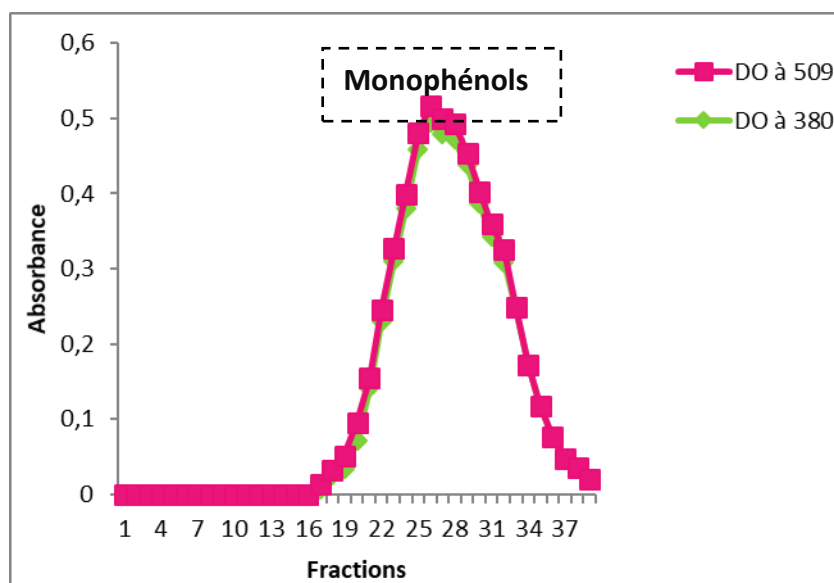


Figure21: La chromatographie d'exclusion d'extrait méthanolique et son absorbance à gauche

Expérimentalement, la chromatographie d'extrait a révélé qu'une seule fraction des monophénols après un temps de 10.5min élucide (21^{ème} tube à 31^{ème}).

La figure 22 montre que l'extrait méthanolique est pauvre en marrubine mais il est riche en d'autres composés.



Figure22: Fractions séparées par chromatographie d'exclusion d'extrait méthanolique.

2.2. Développement du poids

Cette activité de toxicité est testée sur des souris du poids moyen entre 19 et 30 mg. Le développement du poids durant toute la période d'expérience est présenté dans la figure suivante :

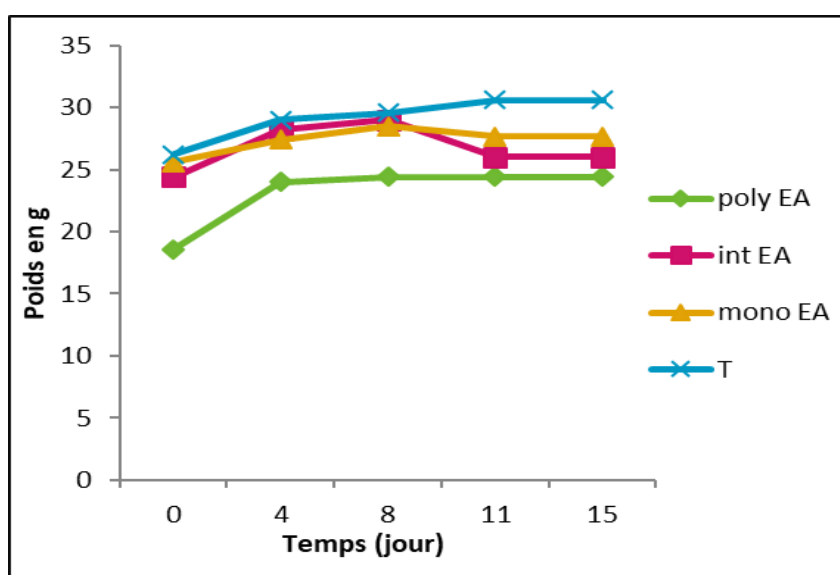


Figure23 : Développement du poids des souris sous l'effet d'extrait aqueux

D'après la figure 23 on constate que de 0 à 4 jours un gain de poids corporel a été observé chez tous les groupes des souris. Après le 4^{ème} jour le poids du témoin augmente normalement. Par contre le poids de ceux qui sont traité par les polyphénols se stabilise immédiatement. Le cas différent pour les groupes qui reçoivent les intermédiaires et les monophénols, chez les premiers le poids diminue jusqu'à le 11^{ème} jour puis se stabilise par contre chez le deuxième groupes le poids augmente jusqu'à le 11^{ème} jour puis se stabilise.

Remarque : La fraction monophénolique provoque la mort de deux individus des souris durant la période d'expérimentation.

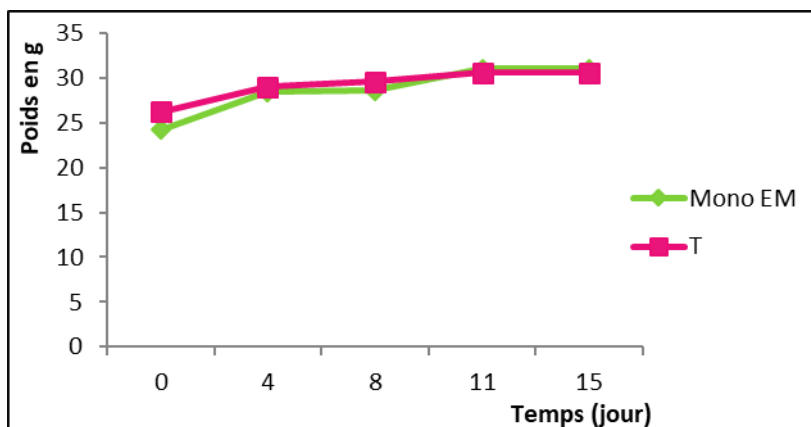


Figure 24 : Développement du poids en g sous l'effet des monophénols d'extrait méthanolique. Mono EM : monophénols d'extraits méthanolique, T : témoin négatif

D'après la figure 24 on constate que le poids s'augmente dans les deux cas (le groupe témoin et le groupe traité) au cours de l'expérimentation sans différence.

Ce résultat des mono d'EM ne montre aucune toxicité sur les souris.

Alors les deux fractions monophénoliques des extraits aqueux et méthanolique se différencient en composition, l'extrait aqueux renferme dans ces constituants un ou plusieurs molécules toxiques responsables de la mort des souris par contre l'extrait méthanolique est dépourvu de cette molécule. En revanche notre molécule à chercher 'la marrubine' qui est présente dans la fraction polyphénolique n'engendre aucun effet toxique sur les souris.

❖ Dissection et l'identification des organes internes

D'après les résultats obtenus dans les figures 23, 24, 25, 26, 27 et 28 on a constaté que la couleur et le poids des organes diffèrent d'une fraction à l'autre.

Cas du foie

Le foie est de couleur normale chez les individus qui reçoivent les poly d'EA. Par contre chez celles qui reçoivent les mono et les Inter d'EA, chez les premiers le foie de couleur normale mais il est dispersé de plusieurs petits points noirs, même cas pour les inter EA sauf que les points sont moins denses que ceux observés par les mono (Figure 25). Parallèlement ce qui concerne l'analyse du poids on a observé que la seule fraction qui ne provoque aucun changement du poids est celle des Mono EA. Au contraire pour les autres fractions qui sont soit faire augmenter le poids (inter EA) ou le faire baisser (Poly EA et Mono EM).

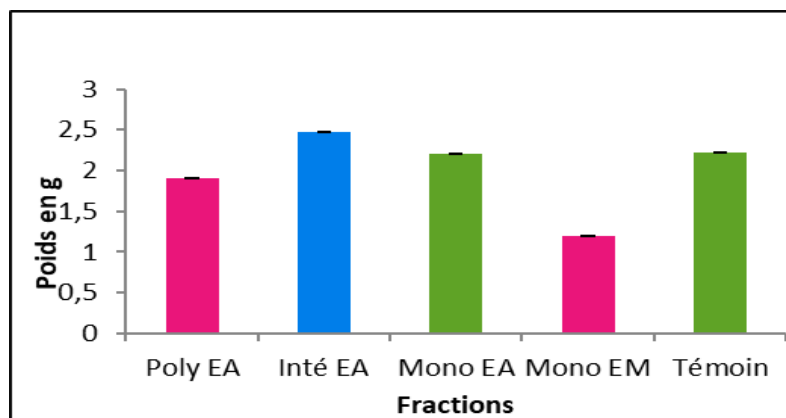


Figure25 : Variation du poids du foie selon les fractions testées

Pour n= 3 et les barres correspondent à l'erreur standard

Cas du cœur

Le cœur est de couleur normale pour toutes les fractions mais en poids apparait normal sauf dans le cas des Mono EM et pour les autres fractions on a remarqué qu'il y a des fractions qui augmentent le poids c'est le cas des Mono EA et d'autres qui le diminuent c'est le cas des inter EA et les Poly EA.

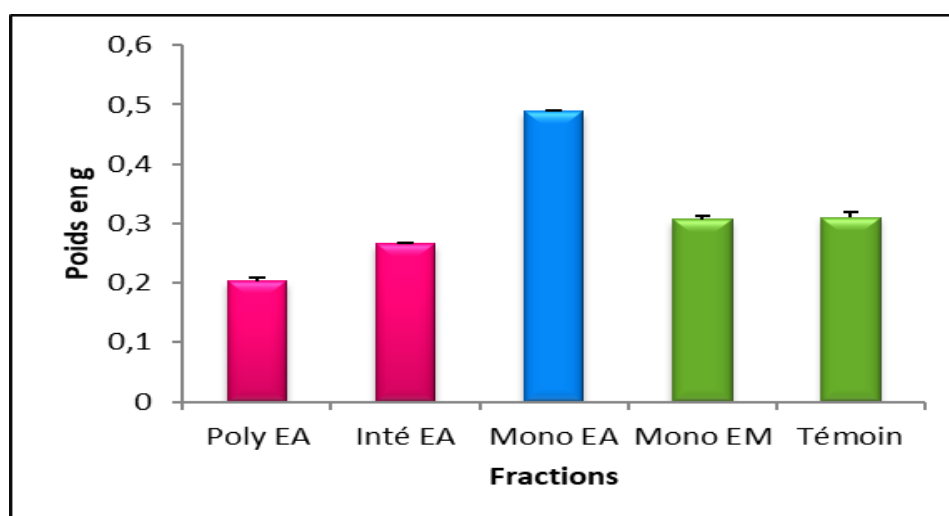


Figure26: Variation du poids du cœur chez les souris selon les fractions

n=3 et les barres en noir c'est l'erreur standard

Cas des poumons

Les poumons dans tous les cas se diffèrent en couleur et en poids par rapport au témoin mais à un degré différent d'une fraction à l'autre. Dans le cas des Mono EA et les Poly EA la couleur est plus ou moins blanche par contre pour les Mono EM et les inter EA sont plus blanche (Figure28).

Par l'analyse du poids on a constaté que les fractions Mono EM, Poly EA et Mono EA ont abaissé le poids. Cependant les inter EA a augmenté le poids.

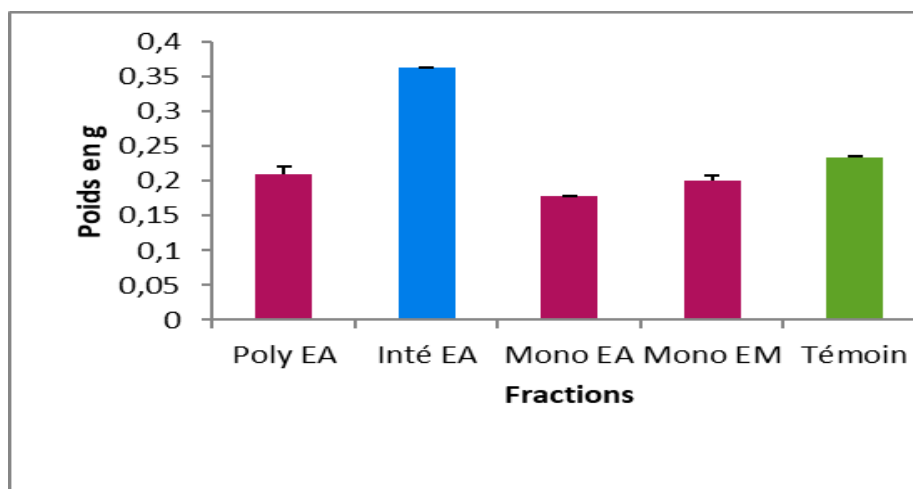


Figure27 : Variation du poids des poumons en fonction des fractions testées
n=3 et les bares correspondent à l'erreur standard

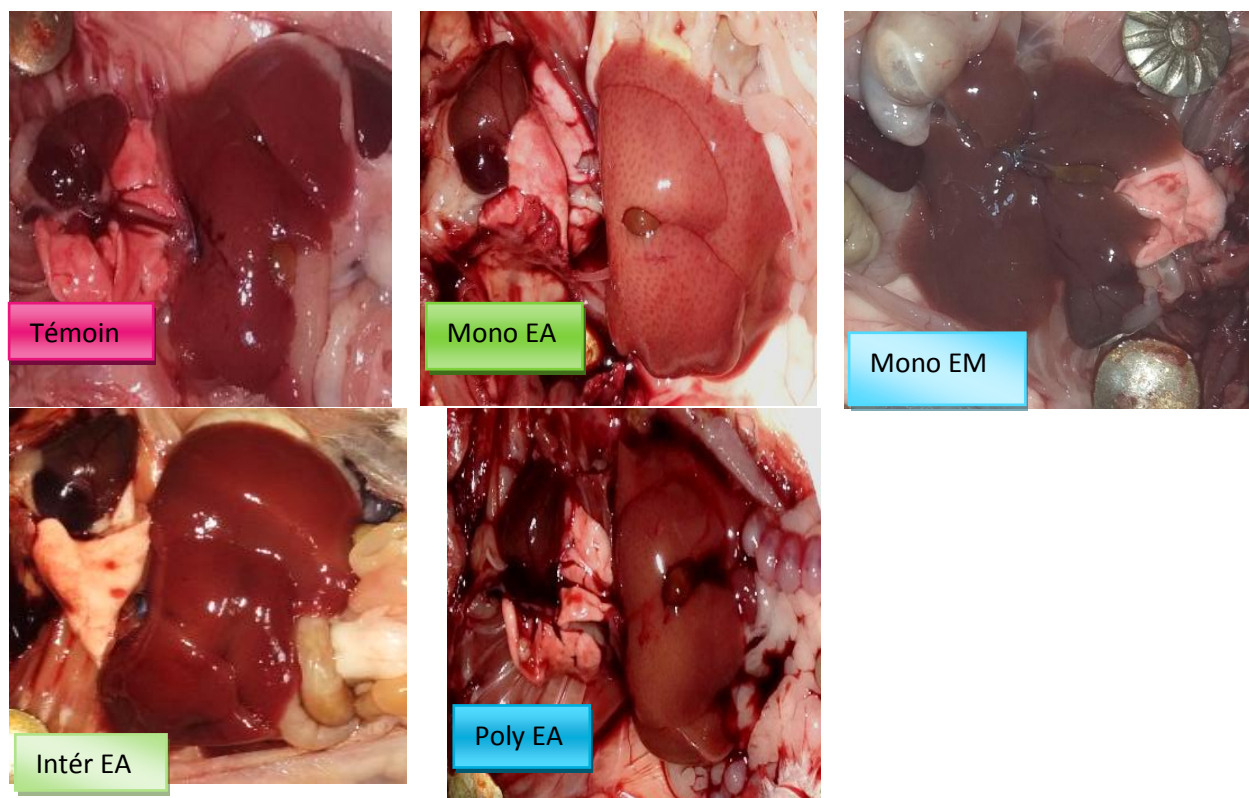


Figure 28:Résultats de la dissection.

Conclusion et perspective

L'étude de l'activité biologique d'extrait aqueux et méthanolique nous a donné des résultats intéressants.

L'analyse quantitative des extraits par un dosage des polyphénols et des flavonoïdes a montré la richesse d'extrait aqueux par rapport à l'extrait méthanolique.

L'analyse des extraits par chromatographie d'exclusion (Séphadex G50) nous a permis de différencier entre l'extrait méthanolique riche en monophénols et l'extrait aqueux riche en monophénols, polyphénols et en composés intermédiaires.

La révélation de l'activité antimicrobienne contre les 4 souches étudiées par la méthode de micro-dilution sur milieu solide, a confirmé que les deux extraits sont plus actifs contre les levures par rapport aux bactéries.

La méthode de CAT a révélé une activité anti-oxydante qui diffère selon le solvant d'extraction utilisé.

L'étude de toxicité a montré l'effet toxique d'une seule fraction d'extrait aqueux ; les monophénols et que les polyphénols dont la marrubine ne présente aucun effet toxique.

Enfin, l'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances et sources naturels biologiquement actives, nous envisageons comme perspective d'utiliser des méthodes modernes pour la séparation et l'identification des molécules présentes dans les deux extraits d'étude pour bien spécifier leurs compositions exactes et de valoriser cette plante sauvage dans les domaines médicales et pharmaceutiques.

Références bibliographique

- ❖ **Ahmad Faraj Atiyat, 1995:** Plantes Médicinales Et Aromatiques Dans Le Monde Arabe, L'agriculture Et La Fabrication De Plantes Médicinales Dans Le Monde Arabe. Institution Arabe Pour Les Etudes Et Publication, P: 2-22.
- ❖ **Ahamet S (2003).** Etudes phytochimiques et des activités biologiques de *Balanites aegyptica* (Balanitaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, p 117.
- ❖ **Al-Bakri A. G. Et Afifi F. U. (2007).** Evaluation Of Antimicrobial Activity Of Selected Plant Extracts By Rapid XTT Colorimetry And Bacterial Enumeration. Journal Of Microbiological Methods, 68, 19 - 25.).
- ❖ **Aouadhi S., 2010:** Mémoire Atlas Des Risques De La Phytothérapie
- ❖ Traditionnelle Etude De 57 Plantes Recommandées Par Les Herboristes.
- ❖ **APG III, 2009:** An Update Of The Angiosperm Phylogeny Group Classification For The Orders And Families Of Flowering Plantes : APG III. Bot. J. Linn. Soc.; 161: 105-121.
- ❖ **Baba Aissa F. (1991).** Les Plantes Médicinales En Algérie. Coédition Bouchène Et Ad-Diwan, P 11,159.
- ❖ **Bellakhdar J.** *Médecine Arabe Ancienne Et Savoirs Populaires : La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle*. Paris, Ibis Press, 1997, 172 P.
- ❖ **Bnouham M, Ziyat A, Mekhfi A, Tahri A, Legssyer A.** Medicinal Plants with Potential Antidiabetic Activity - A Review Of Ten Years Of Herbal Medicine Research (1990–2000). Int J Diabetesmetabol 2006; 14 : 1–25.
- ❖ **Boudjelal A., 2012.** Extraction Et Détermination Des Activités Biologiques De Quelques Extraits Actifs De Plantes Spontanées De La Région De M'sila, Algérie. Thèse De Doctorat, Université Badji Mokhtar. Annaba. 61 P.
- ❖ **Bruneton J.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales, 4e Ed., Revue Et Augmentée, Tec & Doc - Éditions Médicales Internationales, Paris, (2009), 1288.
- ❖ **Burt S (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review.Int. J. Food Microbiol, p: 223-253.
- ❖ **Cavin A (1999).** Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires:*Tinospora crispa* (Menispermaceae) *Merremiaemarginata*(Convolvulaceae) et *Oropheaenneandra*(Annonaceae). Thèse Université de d'Indonésie.
- ❖ **Chiej R (1982).** Les Plantes Médicinales. Ed. Solar.
- ❖ **Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Mascia E., Arzedi E., Palmas F., 1999.** In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology, 29, 130-135.

- ❖ **Ekoumou C (2003).** Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako, p 145.
- ❖ **Fouché J. G. ; Marquet A. Et Hambuckers A., 2000 :** Les Plantes Médicinales De La Plante.
- ❖ **Efendi L and Yajun Y (2008).** Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.*8:172-181.
- ❖ **Gould, K.S. and Lister, C. (2005)** Flavonoid functions in plants. In: Andersen, Ø.M. and Markham, K.R. (Eds), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. CRC Press, Boca Raton, pp. 397-441.
- ❖ **Guignard J.L., 2001.** Botanique Systématique Moléculaire. Ed: Masson. Paris. 290 P.
- ❖ **Macheix J.J., Fleuriet A. And Jaye-Allemand C.** Les Composés Phénoliques Des Végétaux : Un Exemple De Métabolites Secondaires D'une Importance Economique. Presses Polytechniques Et Universitaires Romandes, Lausanne, 2005, 185 P.
- ❖ **Marles RJ, Farnsworth, NR (1995).** Antidiabetic Plants And Their Active Constituents. *Phytomedicine*. 2: 137-189.
- ❖ **Milan S.S. 2011.** Total Phenolic Content, Flavonoid Concentration And Antioxidant Activity Of *Marrubium peregrinum* L. Extracts. *Journal Of Science*.33: 63-72.
- ❖ **Mubashir H.M., Iqbal Zargar M., Bahar Ahmed A., Saroor A.K., Shamshir K. & Singh P., 2009.** Evaluation Of Antimicrobial Activity Of Aqueous Extract Of *Marrubium Vulgare* L. *J. Res. Dev.*, Vol. 9, 53-56.
- ❖ **Nabil GHEDADBA, Leila HAMBAB, M.C.ABERKANE, S. M. Oueld-Mokhtar, Nassima FERCHA, Houas BOUSSELSSLA** Évaluation De L'activité Hémostatique *In Vitro* De L'extrait Aqueux Des Feuilles De *Marrubium Vulgare* L. (*Algerian Journal Of Natural Products* 2:2 (2014) 64-74)
- ❖ **Omar Abdul Razzaqet Mohamed El Sayedhaykle, 1993:** Plantes Médicinales Et Aromatiques Deuxième Edition, Installations Connaissances d'Alexandrie, P: 13-134.
- ❖ **Orhan E., Belhattab R., Senol F.S., Gülpinar A.R., Hosbas S., Kartal M., 2010.** Profiling Of Cholinesterase Inhibitory And Antioxidant Activities Of *Artemisia Absinthium*, *A. Herba-Alba*, *A. Fragrans*, *Marrubium Vulgare*, *M. Astranicum*, *Origanum Vulgare* sub Sp. *Glandulosum* and Essential Oil Analysis Of Two *Artemisia Species*. *Industrial Crops And Products* 32: 566–571.
- ❖ **Patrick B., Jean L., and Michel S (1988).** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1er Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp: 100-108-274.
- ❖ **TJ. Paolini, C. Leandri, J.M. Desjobert, T. Barboni, J. Costa.** Comparison Of Liquid-Liquid Extraction With Headspace Methods For The Characterization Of Volatile Fractions Of Commercial Hydrolats From Typically Mediterranean Species.2008. *J Chromatogr A*.1193. (1-2): 37-49.
- ❖ **Prieto P., Pineda M et Aguilar M (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, p : 269, 337 – 341.

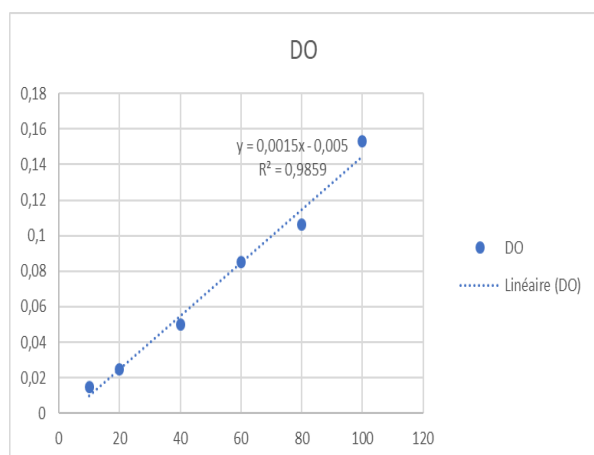
- ❖ **Rhayour K., 2002.** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès. Maroc.158 p.
- ❖ **Schauenberg P. Et Paris F. (2005).** Guide Des Plantes Médicinales: Analyse, Description Et Utilisation De 400 Plantes. Ed: Delachaux Et Niestle, Pp 204 - 207.
- ❖ **SIJELMASSI,** Les Plantes Médicinales Du Maroc. Edition Le Fennec, (2000).
- ❖ **Steven P., Rachel. C., Martha E., Paul. H., Jane S and Peter W.J (2004).** Microbiology of Waterborne Diseases. *Ed Elsevier Academic Press.* pp71-132.
- ❖ **Treutter D.** Mayr U., Michalek S and Feucht W. 1997. Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance. *J. Phytopathol.* 145: 69-75.
- ❖ **Trevoux R.; Arnal-Schnebelen B. Schnebelen J., 2000 :** Interaction
- ❖ Médicamenteuses, Interaction Entre Les Plantes Médicinales Et La Médication Traditionnelle. *Actualités Reproduction Humaine ; VIII (1) :* 28- 32.
- ❖ **Valnet J (1992)** Phytothérapie, Traitement Des Maladies Par Les Plantes. 6^e Edition Maloine, Paris, 712 P Google Scholar
- ❖ **Vansant G (2004).** Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Ed Institut Danone..
- ❖ **Verpoorte R (2002).** La Pharmacognosie Du Nouveau Millénaire: Pistes Et Biotechnologies. Des Sources Du Savoir Aux Médicaments Du Futur, 4^o Congrès Européen D'ethnopharmacologie. *IRD Ed: Paris,* 274 P.
- ❖ **Walton N.J. et Brown D.E., 1999:** Chemical from Plants: Perspectives on
- ❖ plant secondary products; Ed: WORLD SCIENTIFIC; p: 1-14.
- ❖ **Wichtl M., Anton R., 2003.** Plantes Thérapeutiques : Traditions, Pratique Officinale, Sciences Et Thérapeutique. 2e Ed : TEC & DOC. Paris. Pp. 1-364.
- ❖ **Weel K.G.C (1999).** «Antioxidant Activity of Horehound (*Marrubium Vulgare* L.) Grown In Lithuania, *Fett/Lipid* 101, 10, 395–400.
- ❖ **Winkel-Shirley B. 2001.** Flavonoid Biosynthesis.A Chlorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, And Biotechnology.*Plant Physiology.*, 126: 485-493.
- ❖ **Wu X., Beecher G. R., Holden J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt S. E. and Prior R. L. (2004) .** Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities Of Common Foods In The United States. *J. Agricultural And Food Chem.* 52 : 4026–4037.
- ❖ **Yumrutas O., Saygideger S.D., 2010.** Determination Of *In Vitro* Antioxidant Activities Of Different Extracts Of *Marrubium parviflorum* fish And Mey. *Andlamium amplexicaule*l. From South East of Turkey. *Journal Of Medicinal Plants Research.* 4(20): 2164-2172.
- ❖ **Zahra DEHBASHI, Mahta Mazaheri, Saeedeh Saeedi , Seyed Kazem Sabbagh.,2015.** Antibacterial Activity Of *Marrubium Vulgare* L. Against Antibiotic Resistance *Klebsiella Pneumoniae* Strains Page 13(5/7)

ANNEXE 1

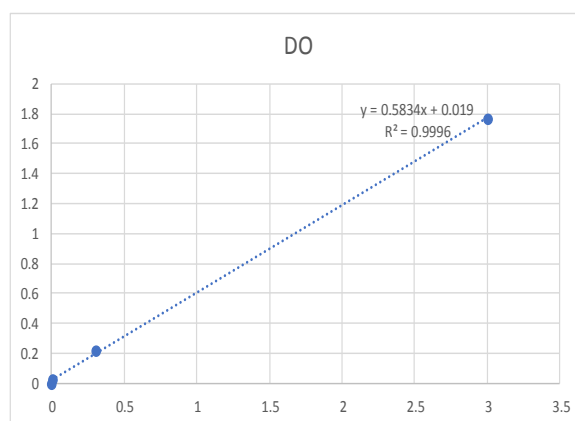
Préparation des milieux YP et LB 250ml solide et 100ml liquide :

	LB		YPG	
Milieu	Solide	Liquide	Solide	Liquide
Extrait de levure en g	1.25	0.5	2.5	1
Tryptone en g	2.5	1	5	2
Agar en g	5	-	5	-
Nacl en g	2.5	1	-	-
Glucose en g	-	-	5	2

ANNEXE 2



ANNEXE 3



ANNEXE 4

