

## Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé

### Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts of *Marrubium deserti* de Noé ex Coss

N. Ghedadba · L. Hambaba · A. Ayachi · M. C. Aberkane · H. Boussetsela · S. M. Oueld-Mokhtar

© Lavoisier SAS 2015

**Résumé** Dans la présente étude, *in vitro*, l'activité antimicrobienne et le pouvoir antioxydant des différents extraits préparés à partir des feuilles du *Marrubium deserti* de Noé ont été étudiés. L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Penicillium digitatum*. L'effet antioxydant a été déterminé par la méthode du blanchiment du  $\beta$ -carotène, le test du DPPH et la méthode FRAP. L'analyse qualitative des extraits par la chromatographie sur couche mince (CCM) a indiqué la présence d'acide gallique, la quercétine, la rutine et le kaempférol. En plus, trois nouveaux métabolites ont été révélés pour la

première fois : l'acide *trans*-cinnamique, l'acide 4-hydroxybenzoïque et le 4-*méthyl*-catéchol. La quantification des phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode  $AlCl_3$  a donné des valeurs plus élevées avec l'EMeOH, où la valeur la plus élevée est estimée par :  $184 \pm 0,78$  mg EAG/100g d'extrait ;  $28,48 \pm 0,40$  mg EQ/100g d'extrait. Cependant, le dosage des tanins condensés par la méthode de la vanilline a révélé que l'EAQ donne la valeur la plus élevée :  $15,68 \pm 0,08$  mg EC/100 g d'extrait. L'évaluation de l'activité antimicrobienne a montré que les extraits méthanolique et dichlorométhanique sont les plus actifs pour l'ensemble des souches testées et ont révélé une activité antibactérienne significative contre *S. aureus* résistant à la méthicilline et *E. coli* (ATCC 25922). En ce qui concerne les valeurs d'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50%) de balayage du radical DPPH, l'EMeOH a montré la plus grande activité inhibitrice avec IC<sub>50</sub> de 15,1  $\mu$ g/ml. En outre, l'extrait méthanolique a montré la plus forte activité antioxydante en utilisant le système d'émulsion d'acide linoléique (76,92%). La méthode FRAP montre que l'EMeOH est le plus actif :  $3,25 \pm 0,06$  EAA/g d'extrait. En conclusion, ces résultats peuvent être considérés comme très prometteurs et justifient la poursuite des recherches, entre autres, sur l'identification des composés antioxydants et antimicrobiens dans les extraits actifs.

N. Ghedadba (✉) · L. Hambaba

Laboratoire de chimie des matériaux et des vivants :  
Activité et réactivité, Département des sciences de la nature  
et de la vie, Faculté des Sciences, Université El-Hadj-Lakhdar,  
05000, Batna, Algérie  
e-mail : viamessi@gmail.com

A. Ayachi

Laboratoire de bactériologie, institut des sciences vétérinaires  
et sciences agronomiques, Université El-Hadj-Lakhdar, Batna,  
Algérie

M. C. Aberkane

Laboratoire de phytochimie, Faculté des Sciences,  
département des sciences de la matière,  
Université El-Hadj-Lakhdar, Batna, Algérie

H. Boussetsela

Laboratoire de biotechnologie des molécules bioactives  
et de la pathologie cellulaire, département des sciences  
de la nature et de la vie, Faculté des sciences,  
Université El-Hadj Lakhdar, Batna, Algérie

S. M. Oueld-Mokhtar

Unité de biodiversité et valorisation des ressources végétales  
(BVRV) – Faculté des sciences et techniques (FST) -  
Université des sciences, de technologie et de médecine (USTM)  
Nouakchott, Mauritanie

**Mots clés** *Marrubium deserti* de Noé · Polyphénols ·  
Activité antimicrobienne · Activité antioxydante · FRAP

**Abstract** In the present study, *in vitro*, antimicrobial activities and the antioxidant capacity of the various extracts prepared starting from the leaves of *Marrubium deserti* de Noé were studied. The antimicrobial activity was evaluated by the method of diffusion against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Penicillium digitatum*. The antioxidant effect was determined by  $\beta$ -carotene bleaching method, the DPPH test and FRAP

assay. Qualitative analysis of the methanolic extract by Thin Layer Chromatography (TLC) revealed the presence of Gallic acid, Quercetin, Rutin and the Kaempferol. Moreover, three new metabolites were investigated for the first time: *trans*-Cinnamic acid, 4-hydroxybenzoïc acid and 4-methyl-Catechol. Quantification of total phenols by Folin-Ciocalteu colorimetric method and flavonoïdes by  $AlCl_3$  method gave higher values with the MeOHE, where the highest value estimated by:  $184 \pm 0.78$  mg GAE/100g of extract;  $28.48 \pm 0.40$  mg QE/100 g of extract. However, the proportioning of the tanins condensed by the method of vanillin revealed that the AQE gives the highest value:  $15.68 \pm 0.08$  mg EC/100g of extract. The evaluation of the antimicrobial activity showed that the methanolic and dichloromethanic extracts are most active on the whole of the bacteria tested and revealed a significant antibacterial activity against *S. aureus* (ATCC 25923) resistant to the methicillin and *Escherichia coli* (ATCC 25922). With regards to  $IC_{50}$  values (50% inhibitory concentration) of scavenging abilities of the DPPH radical, methanol extract exhibited important antioxidant activities with  $IC_{50}$  of 15.1  $\mu$ g/ml. Beside, The methanol extract showed the highest antioxidant activity using the linoleic acid emulsion system (76.92%). Method FRAP shows also that MeOHE is most active:  $3.25 \pm 0.06$  EAA/g of extract. In conclusion, these results can be considered very promising and justify further research, amongst others on the identification of antioxidant and antimicrobial components in the active extracts.

**Keywords** *Marrubium deserti* de Noé · Polyphenols · Antimicrobial activity · Antioxidant activity · FRAP assay

## Introduction

Le stress oxydant a été décrit réellement comme un facteur étiologique crucial impliqué dans diverses maladies chroniques humaines telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénérative, inflammation, diabète *mellitus* et vieillissement [1]. Ces dommages oxydants sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur de divers biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort de cellules [2]. Plusieurs antioxydants synthétiques comme l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT) peuvent être inadéquats pour la consommation humaine chronique car les publications récentes ont mentionné leurs propriétés toxiques possibles pour la santé humaine et l'environnement [3]. De plus, la résistance aux antibiotiques par les microorganismes pathogènes (bactéries, virus, mycètes) est devenue un problème grave car ces contaminations microbiennes touchent toujours la santé publique [3]. Par consé-

quent, l'intérêt pour les antioxydants (non toxiques) normaux et les antimicrobiens, particulièrement de l'origine végétale, a considérablement augmenté ces dernières années.

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de molécules à activités biologique et pharmacologique très variées. Pour cette raison, nous avons choisi *Marrubium deserti* de Noé parmi les plantes médicinales parce qu'elle n'a pas été étudiée en Algérie, bien que relativement abondante et largement utilisée en médecine traditionnelle.

*Marrubium deserti* de Noé (Lamiaceae), est une espèce endémique en Algérie, occupe la totalité du Sahara centrale, répondue beaucoup plus dans les wilayas d'Ouargla, Ghardaïa, El-Goléa et Bechar [4,5]. Cette espèce pousse également au Sahara du Maroc et dans les régions arides en Tunisie [3,6]. Le nom Tamahaq (targuie) de *M. deserti* est *Telher* [7]. C'est un petit arbuste éternel, avec une hauteur de 20 à 30 centimètres. Les tiges droites nombreuses couvertes de poils blancs donnent à la plante un aspect laineux. Les feuilles sont petites, opposées, avec des nervures évidentes. Les fleurs roses dégagent une forte odeur et sont généralement réunies en glomérules compacts espacées sur la tige [6]. Cette plante présente plusieurs applications en médecine traditionnelle. Bellakhdar [6] a décrit l'utilisation des feuilles de *Marrubium deserti* dans plusieurs recettes traditionnelles au Maroc pour guérir différents maux et maladies : colite, colique, toux (sous forme d'infusion) et fièvre. Edziri et al. [3] ont indiqué que les feuilles de *M. deserti* sont employées dans la médecine traditionnelle en Tunisie sous forme de décoction comme un remède pour l'asthme, le diabète et en tant que diurétique. En usage externe, la plante est utilisée dans le traitement des réactions allergiques ainsi que pour soigner les piqûres de scorpion [8]. Zaabat et al. [8,9] ont montré que cette plante possède une activité antioxydante en utilisant deux méthodes : la décoloration du radical cation  $ABTS^+$  et la réduction de l'ion métallique par la méthode CUPRAC. Cette espèce possède également des activités antigénotoxique et antivirale significative contre Cocksackie B virus type 3 : CoxB-3 [3,9].

*M. deserti* est riche en flavonoïdes, Zaabat et al. [8,9] ont pu isoler quatre hétérosides de l'apigénine : apigénine-7-O- $\beta$ -néohesperidoside ; apigénine-7-O-glucoside (la cosmosiine); la terniflorine : apigénine-7-O-6''-E-p-coumaroyl-glucoside et l'apigénine-7-O-glucuronide. Ces flavonoïdes ont été isolés à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle et de *n*-butanol des parties aériennes de *M. deserti*. En plus, deux phénylpropanoïdes glycosylés ont été identifiés dans le même extrait : l'actéoside et le forsythoside B [9]. A partir de l'extrait dichlorométhanique des parties aériennes de *M. deserti*, [9] ont pu isoler pour la première fois deux nouveaux diterpènes labdaniques : la désertine ( $C_{22}H_{36}O_8$ ) et la marrulibacétal A ( $C_{21}H_{32}O_7$ ). En plus, d'autres diterpènes ont déjà identifiés : cyllenine A et 15-épi-cyllenine A [10], marrubiine [11] et marrulactone [12]. L'objectif principal de cette

étude est d'élucider *in vitro* l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles du *M. deserti* contre quelques bactéries gram positives et gram négatives, une levure (*Candida albicans*) et deux champignons : l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium digitatum*. Le deuxième objectif de cette étude est de déterminer son pouvoir antioxydant au moyen de trois tests : Le balayage des radicaux libres de DPPH (2, 2' - diphényl-1-picrylhydrazyl), la méthode de blanchiment du  $\beta$ -carotène et la méthode FRAP.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Les feuilles de *Marrubium deserti* de Noé ont été récoltées à la fin du mois de mars 2012 dans la région de Daya-Mogheul, Wilaya de Bechar (Algérie). L'espèce fraîchement récoltée a été identifiée par le Professeur Hocine Laouer (département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ferhat-Abbas, Sétif, Algérie) et séchée dans la salle fongée pour empêcher la photo-oxydation puis écrasée en une poudre fine.

### Souches bactériennes utilisées

Trois souches de référence : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Ces souches sont obtenues à partir des prélèvements au niveau de laboratoire de Microbiologie de Centre Hospitalier Universitaire de Batna (CHU). Le clone de *S. aureus* apporté est connu pour sa résistance à la méthicilline dit MRSA : methicillin resistant *S. aureus*. Deux souches issues à partir des prélèvements (pus) de malades : *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella thyphimurium*. Les souches bactériennes sont cultivées sur gélose Mueller-Hinton.

### Souches fongiques

Les souches fongiques sont issues à partir des prélèvements de malades (oreille, selles, langue). Il s'agit d'une souche de levure : *Candida albicans* et deux champignons : l'*Aspergillus niger* et *Penicillium digitatum*.

### Réactifs chimiques

Les solvants suivants ont été employés pour l'extraction : éther de pétrole, dichlorométhane, méthanol. Solvants utilisés pour la chromatographie préparatoire et l'activité antioxydante : chloroforme, acétate éthylique, *n*-butanol. Des standards des acides phénoliques (acide gallique) et des flavonoïdes (quercétine) ont été obtenus à partir de « Sigma Aldrich ». Le réactif des phénols de Folin-Ciocalteu et le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) ont été achetés de « Fluka Chemie ». Les

réactifs suivants ont été employés dans les expériences d'activité antioxydante : Tween 40,  $\beta$ -carotène, acide linoléique (pureté CA 99%), 2, 2' - diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich Chemie), l' $\alpha$ -tocophérol, tampon phosphate (0,2M; pH 6,6), potassium hexacyanoferrate [ $K_3Fe(CN)_6$ ], l'acide trichloracétique,  $FeCl_3$  1%. Les standards utilisés pour la CCM : acide *trans*-Cinnamique, acide 4-hydroxybenzoïque, 4-méthyl-Catéchol, rutine et kaempférol sont achetés du « Sigma Aldrich CO., ST Louis, Mo ».

### Préparation des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé

Selon le protocole de Diallo et al. [13] différents types d'extraits ont été préparés à partir des feuilles pulvérisés pendant vingt-quatre heures (100 g) en utilisant 1L des solvants à polarité croissante (éther de pétrole, dichlorométhane, butanol, méthanol). A la fin de l'extraction, les quatre extraits organiques ont été concentrés sous vide au Rotavapor aux températures 35 °C, 40 °C et 50 °C respectivement. Après la concentration, ces extraits ont été séchés à l'air libre. Pour l'extrait aqueux, une macération aqueuse de 100 g de la poudre à raison de 1 L d'eau distillée a également été effectuée. L'extrait aqueux obtenu est ensuite centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 minutes pour se débarrasser des débris de plante. La phase aqueuse du macérat a été ensuite filtrée sur un papier filtre. Le filtrat obtenu est ensuite mis dans des tubes, congelé à -20°C puis lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur. La congélation de l'extrait lyophilisé à -20°C est une condition nécessaire afin de garder intacte les molécules extraites de la partie aérienne de *M. deserti*.

### Criblage phytochimique

#### *Caractérisation des flavonoïdes (test de Shibata ou Shinoda test)*

La présence des flavonoïdes dans les différents extraits a été mise en évidence par la réaction à la cyanidine. Une quantité de 0,5 g de chaque extrait a été dissous dans 1,5 ml du méthanol (50%) et chauffé sur le bain d'eau bouillante. Cinq ml d'HCl et quelques fragments de magnésium ont été ajoutés. Après dégagement d'hydrogène par réduction des flavonoïdes aglycones en anthocyanes, on obtient une coloration rouge [14].

#### *Caractérisation des polyphénols*

La réaction au chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) a permis de caractériser les polyphénols. A 2 ml de chaque extrait, nous avons ajouté une goutte de solution méthanolique de chlorure ferrique à 2%. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence de polyphénols [15].

### Caractérisation des tanins (test au $FeCl_3$ )

Une quantité de 15 ml du réactif de Stiasny a été ajoutée à 5 ml de chaque extrait. Le mélange a été maintenu au bain-marie à 80°C pendant 30 min. L'observation d'un précipité en gros flocons a caractérisé les tanins catéchiques. Pour les tanins galliques, nous avons filtré la solution précédente.

Le filtrat est recueilli et saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de  $FeCl_3$  provoquerait l'apparition d'une coloration bleu-noir intense, signe de la présence de tanins galliques [15].

### Caractérisation des stérols et polyterpènes (Lieberman-Burchard's test)

Les extraits Ethéropétrolique et Dichlorométhanique (Eep, EDCM) (5 ml) sont additionnés chacun de 1 ml d'anhydride acétique puis de 0,5 ml de chloroforme, après dissolution, les solutions sont transférées dans des tubes à essai auxquels sont ajoutés 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, a indiqué une réaction positive [15].

### Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les cinq extraits ont été analysés en utilisant la chromatographie sur couche mince en tant qu'empreinte digitale. Plats du silica-gel (Merck) (60 GF<sub>254</sub> de taille 20x20cm), en utilisant : chloroforme/méthanol /eau (65: 35: 5; v/v/v) en tant que système de solvants pour les extraits polaires, tandis que pour les extraits apolaires en utilisant: l'éther de pétrole/acétate éthylique (80: 20; v/v) [13].

Huit témoins ont été employés : la quercétine, la rutine, le kaempférol, l'acide gallique, l'acide tannique, acide *trans*-Cinnamique, acide 4-hydroxybenzoïque, 4-méthyl-Catéchol (Sigma Aldrich). La chromatographie sur couche mince a été observée sous la lampe UV à 254-366 nm et par la pulvérisation du réactif : la vanilline sulfurique. La détection des composés ayant un balayage d'activité de DPPH est effectuée par pulvérisation d'une solution méthanolique de DPPH (à 2 mg/ml), les taches jaunes ont indiqué la présence des composés actifs. Le rapport frontal ( $R_f$ ) des taches résultant de la séparation ont été calculés et comparés à ceux des témoins, permettant ainsi l'identification des divers composés des extraits [13].

### Dosage des polyphénols totaux

Les cinq extraits (200 µl) ont été mélangés à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et à 2 ml de  $H_2O$ , et incubés à la température ambiante pendant 4 minutes. Après l'addition de 0,8 ml de bicarbonate de sodium de 7,5% au mélange, les polyphénols totaux étaient déterminés après

2 heures d'incubation à la température ambiante. L'absorbance de la couleur bleue en résultant a été mesurée au  $\lambda_{max} = 765$  nanomètres avec un spectrophotomètre de Shimadzu UV-VIS. La quantification a été faite en ce qui concerne la courbe standard de l'acide gallique. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique (EAG) par 100g d'extrait [16].

### Dosage des flavonoïdes totaux

Une quantité de 1 ml de chaque échantillon et de standard (préparée dans le méthanol) est ajoutée à 1 ml de la solution d' $AlCl_3$  (2 % dissous au méthanol). Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée par rapport au blanc préparé de réactif au  $\lambda_{max} = 430$  nanomètres. Les concentrations des flavonoïdes ont été déduites à partir de la gamme de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (0-35 µg/ml). Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de quercétine par 100 g d'extrait : mg EQ/100g d'extrait [17].

### Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode de la vanilline décrite par Julkumen-Titto [18]. En effet, la vanilline réagit avec les flavan 3-ols libres et les unités terminales des proanthocyanidines donnant une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle aux taux de flavanols présents dans le milieu et qui présente un maximum d'absorption à 500 nm de longueur d'onde. Des aliquotes de 0,1 à 1 ml de la solution mère (0,5 mg/ml) de catéchine et des extraits ont été introduits dans une série de tubes à essai, le volume finale dans chaque tube a été complété à 1ml par addition de méthanol absolu. 1,5 ml de la vanilline à 4% solubilisé dans le méthanol et 750 µl de l' $HCl$  (12M) à 37% ont été ajoutés et à une minute d'intervalle à chaque tube de la série et mis par la suite au bain marie réglé à 30°C pendant 20 minutes. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de catéchine par 100 g d'extrait (mg EC/100 g d'extrait).

### Activité antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits préparés, on a utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé. Le principe de cette méthode est d'imprégner des disques de papier Wathman n°1 de 6 mm de diamètre avec les substances à tester. Les disques ont été imprégnés dans différentes solutions (1g/ml) (solution mère) des extraits dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour les extraits organiques et dans l'eau distillée stérile pour l'extrait aqueux. Une dilution en série de cette solution mère, permet d'obtenir diverses solutions filles (réalisation d'une gamme de concentrations de 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16). Un disque imbibé par le DMSO a été employé en tant que contrôle négatif. Ensuite, ils sont déposés



à la surface d'un milieu écouvillonné par une suspension microbienne, gélose Muller-Hinton pour les bactéries, Sabouraud pour les souches fongiques. A la fin de la durée d'incubation (18-24h pour les souches bactériennes, 48h pour la levure et 10 jours pour les champignons) à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés [19].

### Activité antioxydante

#### Test de blanchiment du $\beta$ carotène

L'activité antioxydante des cinq extraits du *M. deserti* a été mesurée selon le protocole décrit par Kartal et al. [20] avec de légères modifications. L'émulsion de  $\beta$ -carotène/acide linoléique a été préparée par la solubilisation de 0,5 mg de  $\beta$ -carotène dans 1 ml de chloroforme, 25  $\mu$ l d'acide linoléique et 200 mg de tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été complètement évaporé dans le Rotavapor à 40 °C, ensuite 100 ml d'eau oxygénée ont été ajoutés, l'émulsion en résultant a été agitée vigoureusement. 500  $\mu$ l de solution d'extrait ou d'antioxydant de la référence ( $\alpha$ -tocophérol) (solubilisé dans le méthanol) ont été ajoutés à 2,5 ml de l'émulsion précédente. Un contrôle négatif contenant 0,5 ml de méthanol au lieu de l'essai témoin a été effectué en parallèle. L' $\alpha$  tocophérol a été employé comme contrôle positive. L'absorbance a été mesurée à 490 nanomètres avant et après le traitement thermique avec des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) a été calculée comme suit :

$$\text{AAR} = [\text{Abs}_{\text{t: 48h}}(\text{échantillon})/\text{Abs}_{\text{t: 48h}}(\alpha \text{ tocophérol})] \times 100\%$$

#### Effet radical-balayage de DPPH

Afin d'étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits des feuilles de *Marrubium deserti*, nous avons utilisé la méthode basée sur le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) comme un radical relativement stable, selon le protocole décrit par Sanchez-Moreno [21]. Brièvement, la solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 50  $\mu$ l des solutions des extraits du *M. deserti* ou des standards (quercétine, rutine, acide ascorbique) ont été ajoutés à 1,96 ml de DPPH, les mélanges ont été incubés dans l'obscurité pendant 30 minutes et la décoloration comparée à la contrôle négative contenant seulement la solution de DPPH mesurée à 517 nanomètres en utilisant un spectrophotomètre UV/visible type *Biotech Engineering Management*. L'activité de radical-balayage de DPPH a été calculée comme suit :

$$\%(\text{AA}) = [(\text{A}_{517} \text{ control} - \text{A}_{517} \text{ échantillon})/\text{A}_{517} \text{ control}] \times 100$$

Sachant que le control  $A_{517}$  : est l'absorbance de la réaction de control (contenant tous les réactifs excepté l'échan-

tillon d'essai), et l'échantillon  $A_{517}$  : est l'absorbance des extraits ou de la référence.

### Méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power or Plasma)

La méthode FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés [22]. Dans un tube à essai contenant 0,5 ml de solution d'échantillon (0,1 mg/ml), ont été ajoutés 1,25 ml de tampon phosphate (0,2M : pH 6,6) puis 1,25 ml de potassium hexacyanoferrate [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] 1% dans l'eau distillée. L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 30 minutes. Un volume de 1,25 ml d'acide trichloracétique (10%) est ensuite ajouté et le mélange est centrifugé à 2000 rpm pendant 10 minutes. Trois aliquotes de 0,625 ml ont été effectués dans trois tubes eppendorf auxquels ont été ajoutés 0,625 ml d'eau distillée et 0,125 ml de  $\text{FeCl}_3$  1% fraîchement préparé dans de l'eau distillée. Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions. La lecture est faite à 700 nm contre une courbe étalon d'acide ascorbique (200 mg/l dans l'eau distillée). La concentration des composés réducteurs (antioxydants) dans l'extrait est exprimée en mmol Equivalent Acide Ascorbique (EAA)/g d'extrait sec selon la formule :

$$C (\%) = \frac{c \times C \times 100}{M \times C_i}$$

C : Concentration en composés réducteurs en mmol EAA/g d'extrait sec ; c : Concentration de l'échantillon lue ;

$C_i$  : Concentration de la solution mère d'extrait ; M : Masse molaire de l'acide ascorbique (176,1 g/mol)

#### Analyse statistique

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

## Résultats et discussion

### Principaux constituants chimiques des extraits

#### Réactions de caractérisation

Les études phytochimiques effectuées sur les feuilles de *M. deserti* de Noé ont donné les résultats reportés dans le Tableau 1.

<b>Tableau 1</b> Résultats de la caractérisation des groupes chimiques dans des extraits de feuilles de <i>M. deserti</i> .		
<b>Groupes chimiques</b>	<b>Extraits</b>	<b>Résultats des réactions en tube</b>
Flavonoïdes : génines flavoniques ( <i>Shibata</i> )	Méthanol	++
Flavonoïdes : hétérosides flavoniques ( <i>Shibata</i> )	Méthanol	+++++
Saponosides : mousse	Extrait aqueux lyophilisé	+++
Polyphénols : réaction avec FeCl <sub>3</sub>	<i>n</i> -Butanol, méthanol, eau	+++
Tanins catéchiques : réaction de Stiasny	Eau	+++++
Tanins galliques : réaction de Stiasny	Méthanol	+
Stérols et triterpènes : <i>Liebermann</i>	Ether de pétrole, dichlorométhane	+++
Précipité ou coloration : très abondant : +++++ ; abondant : +++ ; moyen : ++, louche : +.		

Les essais phytochimiques effectués sur les extraits des feuilles de *Marrubium deserti* ont révélé la présence de composés phénoliques, de flavonoïdes, de saponosides, de tanins, de stérols et/ou terpénoïdes.

### Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince après la révélation par l'UV à 254-366 nm et le réactif de Godin a montré plusieurs taches dans chaque extrait. Après la comparaison avec les standards disponibles migrés dans le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (65:35:5) on a révélé la probabilité de la présence de l'acide gallique (Rf = 0,85), de la quercétine (Rf = 0,88), de la rutine (Rf = 0,61), de kaempférol 3-*O*-glucoside (Rf = 0,48) dans l'EMeOH. Ces flavonoïdes ont été mis en évidence et purifiés à partir de différents végétaux. Par exemple, Rigano *et al* [23] ont identifié et purifié 11 flavonoïdes à partir de l'extrait au méthanol de la plante *Marrubium globosum* dont le kaempférol-3-*O*-glucoside et la quercétine. De plus, trois nouveaux métabolites ont été révélés pour la première fois : l'acide *trans*-cinnamique : C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> (Rf = 0,75), l'acide 4-hydroxybenzoïque : C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (Rf = 0,54) et le 4-*méthyl*-Catéchol : C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> (Rf = 0,79). Avec la connaissance des auteurs le 4-*méthyl*-catéchol est connu pour induire la production des facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau. Les taches des chromatogrammes des extraits d'éther de pétrole (Rf 0,40 ; 0,45 ; 0,57 ; 0,79), dichlorométhane (Rf 0,45 ; 0,57 ; 0,72 ; 0,89) se colorent

en violet après révélation au réactif de Godin : ce sont probablement des stérols et des triterpènes.

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

### Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Tout le contenu phénolique dans les extraits examinés de *M. deserti* utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est exprimé en termes d'équivalent d'acide gallique (l'équation standard de courbe :  $y = 0,008x + 0,070$  ;  $R^2 = 0,992$ ). Les résultats obtenus pour la concentration des polyphénols totaux sont exprimées en mg EAG/100 g d'extrait (Tableau 2). Tout le contenu phénolique dans les extraits examinés s'est étendu de 17 à 184 mg EAG/100 g d'extrait.

La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait méthanolique et aqueux. Tout le contenu phénolique dans les extraits du *M. deserti* dépend du type d'extrait, c'est à dire de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction. La solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires donne la concentration élevée de ces composés dans les extraits obtenus en utilisant les solvants polaires pour l'extraction [24].

La concentration des flavonoïdes dans divers extraits du *Marrubium deserti* de Noé était déterminée en suivant la méthode spectrophotométrique avec du chlorure d'aluminium. Le contenu des flavonoïdes a été exprimé en termes de mg équivalent de quercétine EQ/100g d'extrait, l'équation standard de courbe:  $y = 0,032x - 0,002$  ;  $R^2 = 0,994$  (Tableau 3). La concentration des flavonoïdes dans les extraits de *M. deserti* s'est échelonnée de 2,42 à 28,48 mg EQ/100g d'extrait. L'extrait méthanolique contenant la concentration de flavonoïde la plus élevée. La concentration des flavonoïdes dans l'extrait de méthanol était  $28,48 \pm 0,40$  mg EQ/100 g d'extrait, suivie par l'extrait aqueux lyophilisé

**Tableau 2** Contenu phénolique total dans les extraits de feuilles de *M. deserti* de Noé.

<b>Extrait</b>	<b>Polyphénols totaux<sup>a</sup></b>
Ether de pétrole	17 ± 0,82
Dichlorométhane	34 ± 0,43
<i>n</i> -Butanol	133 ± 0,91
Méthanol	184 ± 0,78***
Eau	171 ± 0,30

<sup>a</sup>Equivalent acide Gallique (mg EAG/100 g d'extrait) ; \*: valeur hautement significative ( $P < 0.0001$ ).

<b>Tableau 3</b> Contenu total de flavonoïdes dans les extraits de feuilles de <i>M. deserti</i> de Noé.	
<b>Extrait</b>	<b>Flavonoïdes totaux<sup>a</sup></b>
Ether de pétrole	2,42 ± 0,12
Dichlorométhane	5,81 ± 0,14
n-Butanol	16,17 ± 0,42
Méthanol	28,48 ± 0,40*
Eau (EAQ lyophilisé)	26,13 ± 0,63

<sup>a</sup>Équivalent Quercétine (mg EQ/100 g d'extrait) ; \*\*\*: valeur significative ( $P < 0.05$ ).

(26,13 ± 0,63) et butanolique (16,17 ± 0,42). La plus faible concentration de flavonoïde a été mesurée dans l'EEp (2,42 ± 0,12 mg EQ/100 g d'extrait). La concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation d'extrait [24]. Le type de standard utilisé (quercétine, rutine) peut aussi changer les résultats [25].

### Dosage des tanins condensés

Les résultats obtenus pour la concentration des tanins condensés sont reportés dans le Tableau 4.

D'après cet résultats, l'extrait aqueux a donné la teneur la plus élevée de 15,68 ± 0,08 mg EC par 100 g d'extrait et ça en accord avec les résultats de nombreux chercheurs qui ont indiqués que l'eau enregistre les teneurs les plus élevées en tanins condensés suivie par l'éthanol et l'acétone soient en moyenne et le méthanol extrait faiblement les tanins quel que soit le mode d'extraction, mais le problème est que l'eau et l'acétone, spécialement à hautes températures, extraient aussi des substances indésirables comme les protéines, les lipides et les colorants non phénoliques qui causent des interférences lors de dosage des tanins. On peut alors conclure que l'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires. Or, les teneurs en tanins condensés peuvent être variables aussi en raison de plusieurs facteurs tels que : la sensibilité des tanins à des plusieurs voie de dégradation (l'oxydation, la lumière...), le stade de maturité des fruits, les conditions culturales, climatiques, pédologiques ou le stress de prédation [18]. Des études récentes ont montrés l'effet vasoconstricteur des tanins, on peut alors mentionner un travail qui doit être réalisé dans les années à venir c'est « l'évaluation de l'activité hémostatique et anticoagulante de l'EAQ de *M. deserti* ».

### Activité antimicrobienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles de *Marrubium deserti* sont reportés dans le

<b>Tableau 4</b> Contenu total de tanins condensés dans les extraits de feuilles de <i>M. deserti</i> de Noé.	
<b>Extrait</b>	<b>Tanins<sup>a</sup></b>
Ether de pétrole	Ne contient pas des tanins
Dichlorométhane	Ne contient pas des tanins
n-Butanol	0,97 ± 0,23
Méthanol	6,56 ± 0,44
Eau	15,68 ± 0,08***

<sup>a</sup>mg EC par 100 g d'extrait ; \*\*\* valeur hautement significative ( $P \leq 0,001$ ).

Tableau 5. Les résultats obtenus montrent que tous les extraits des feuilles ont une activité d'inhibition significative contre la croissance bactérienne avec un degré différent lié au contenu des extraits, ce qui confirme le spectre large de l'activité antimicrobienne de ces feuilles. Les extraits dichlorométhane et méthanolique ont produit des zones d'inhibition plus grandes contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (MRSA), les diamètres de la zone d'inhibition ont été variés entre 14,73 ± 0,42 et 15,29 ± 0,1 respectivement. Dans ce travail, les valeurs de CMI (la concentration inhibitrice minimale) ont été calculées. L'EMeOH par exemple agit sur les germes a une concentration de 500 mg/ml correspondent a une dilution de 1/2.

L'action de l'EMeOH sur la bactérie *Staphylococcus aureus* (MRSA) peut être due aux flavonoïdes qui sont des bons inhibiteurs des sortases (enzymes trouvés dans la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif qui catalysent l'ensemble des protéines de surface, par exemple adhésines et internalines) [26] récemment démontrent que des quantités infimes du Rutine inhiber sortases A et B. En effet, la totalité des bactéries de *S. aureus* traités avec Rutine ont montré une diminution de liaison au fibrinogène, l'un des ligands d'accueil à laquelle les bactéries se fixent lors de l'infection. D'autre part, la capacité de *S. aureus* de provoquer une maladie est largement attribuable à sa capacité à sécréter des enzymes et des toxines. Des études récentes ont montré que les flavonoïdes inhibent la libération de facteurs de virulence de cette bactérie. Cushnie et Lamb [26] constatent que l'épigallocatechine empêche la sécrétion de la coagulase et  $\alpha$ -toxine. L'EDcM exerce un effet inhibiteur contre *E. coli* (agent causatif de la diarrhée), on peut déduire alors que *M. deserti* possède une activité anti-diarrhéique qui a été établie pour la première fois. Cette activité pourrait être due à la marrulibacétal A [8].

Concernant les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *salmonella thyphimurium*, aucune zone d'inhibition de croissance n'a été constatée autour des disques, ce qui montre la résistance de ces souches. Cette dernière est due à la différence de la structure de la paroi

**Tableau 5** Activité antibactérienne et antifongique des extraits de feuilles de *Marrubium deserti* de Noé.

Extrait Souches	Ether de pétrole (EEP)	Dichlorométhane (EDcM)*	n-Butanol (EBuOH)	Méthanol (EMeOH)*	Eau (EAQ lyophilisé)
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	7,9 ± 0,87	9,91 ± 0,08	11,23 ± 0,12	15,29 ± 0,1	13,51 ± 0,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	14,73 ± 0,42	7,8	12,08 ± 0,6	9,27 ± 0,10
<i>Salmonella thyphimurium</i>	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	5,36 ± 0,25	-	8,40 ± 0,20	6,56 ± 0,13
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	4,70 ± 0,05	-
<i>Penicillium digitatum</i>	-	-	-	-	-

Les valeurs sont une moyenne de trois essais ± SD (les zones d'inhibition sont mesurées en mm) ; - : signifie souches résistantes ; \* : CMI = 500 mg/ml pour l'EMeOH et 1 g/ml pour l'EDcM.

cellulaire entre les bactéries gram (+) et les bactéries gram négatives [26]. En effet, Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle : la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Les deux souches fongiques : *Aspergillus niger* et *Penicillium digitatum* montre également une forte résistance. Seulement la levure *Candida albicans* a été révélée sensible vis-à-vis l'EMeOH (8,40 ± 0,20).

### Test de blanchiment du $\beta$ carotène

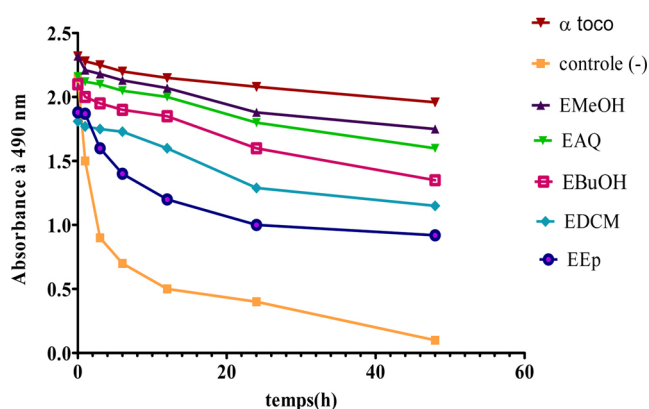
Dans cette analyse, la capacité antioxydante est déterminée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et de la formation des hydroperoxydes conjugués *diène* résultant de l'oxydation de l'acide linoléique, qui attaquent simultanément le  $\beta$ -carotène et ayant comme résultat le blanchiment du  $\beta$ -carotène et la disparition de sa couleur jaune [27].

Cette méthode est employée couramment parce que le  $\beta$ -carotène montre une activité biologique forte et est un composé physiologique important [27]. En outre, le  $\beta$ -carotène est employé comme agent de coloration en boissons et sa décoloration réduirait nettement la qualité de ces produits [27].

De ce fait, il est employé dans l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *M. deserti*. La cinétique de blanchiment du  $\beta$ -carotène en présence et en absence des extraits de feuilles de *Marrubium deserti*, de l'antioxydant standard et les activités antioxydantes relatives (AAR) sont représentés dans la Figure 1.

Comme l'indique cette Figure 1 les courbes ont la même allure qui implique la même interprétation :

- **Au temps ( $t_0$ )** : la densité optique de tous les extraits, le standard et le contrôle (-) étant presque la même et pré-



**Fig. 1** Cinétique de blanchiment du  $\beta$ -carotène à 490 nanomètre des extraits de feuilles du *M. deserti* et de l' $\alpha$ -tocophérol. Chaque valeur est la moyenne de trois analyses

sentent un seuil d'absorbance d'environ 2,35. Cela est expliqué par l'effet que a ce moment là il n'y a aucun RL qui a été formé dans le milieu réactionnel, par conséquent le  $\beta$ -Carotène reste hautement insaturé, la couleur jaune confère alors une absorbance maximale, c'est la phase **d'initiation** [28] ;

- **Au temps ( $t : 2h$ )** : l'absorbance commence à diminuer progressivement pour tous les extraits, le standard et le contrôle (-), ce qui indique sans doute le début de la formation des RLs dans le milieu réactionnel généré par l'acide linoléique suite à la rupture des doubles liaisons par le tween 40, c'est la phase de **propagation** [28] ;
- **Après ce temps ( $2h < t \leq 48h$ )** : l'étude de cinétique de blanchiment du  $\beta$ -carotène montre que celui-ci diminue graduellement avec le temps, pour atteindre un état stationnaire au bout de 48 heures, étant donné que le nombre de RLs devient important. Après ce temps là, il reste constant ce qui montre que toutes les doubles liaisons présentes dans le  $\beta$ -carotène sont dégradées, ce qui



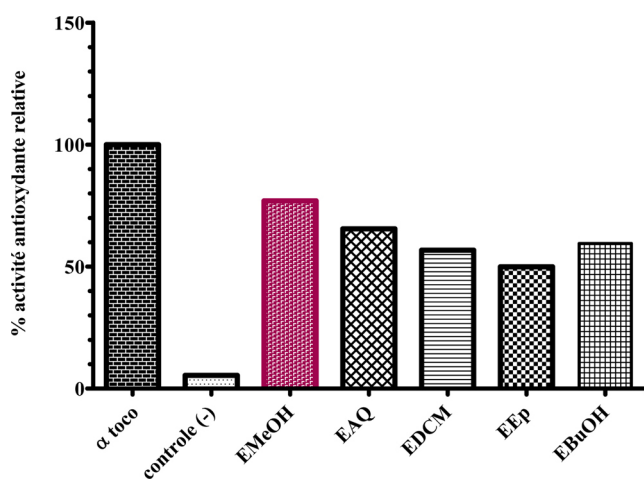
s'achève à l'épuisement irréversible de la coloration jaune par la transformation en une couleur blanche, c'est donc le blanchiment total du  $\beta$ -carotène, c'est la phase de **terminaison** [28].

Les résultats de blanchiment du  $\beta$ -carotène (Fig. 2) ont indiqué que l'activité la plus élevée a été montrée par l'extrait au méthanol du *M. deserti* (AAR = 76,92%) suivi par l'extrait aqueux (AAR = 65,47%) et l'extrait butanolique (AAR = 59,48). Les extraits étheropétrolique et dichlorométhanique ont présenté également une activité importante.

D'après les résultats obtenus, il est clair que l' $\alpha$ -tocophérol et les différents extraits testés des feuilles de *Marrubium deserti* inhibent d'une manière significative ( $p \leq 0,05$ ) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$  carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation.

L'activité antioxydante des extraits polaires pourrait s'expliquer par leur richesse en substances polyphénoliques. C'est pourquoi, l'analyse statistique montre la présence d'une corrélation linéaire significatif entre la teneur de ces extraits en polyphénols totaux, en flavonoïdes et le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique ( $R = 0,87$  ;  $r = 0,83$ ) respectivement, ce qui indique la contribution de ces composés qui sont les antioxydants dominants dans ces extraits.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de plusieurs publications, qui ont rapporté une corrélation positive entre tout le contenu phénolique et l'activité antioxydante [27,28]. L'activité antioxydante dépend de plusieurs facteurs, par exemple : la concentration des extraits, la méthode d'évaluation, la sensibilité des antioxydants à la température de l'essai et la nature hydrosoluble ou liposoluble de l'antioxydant [27,28].

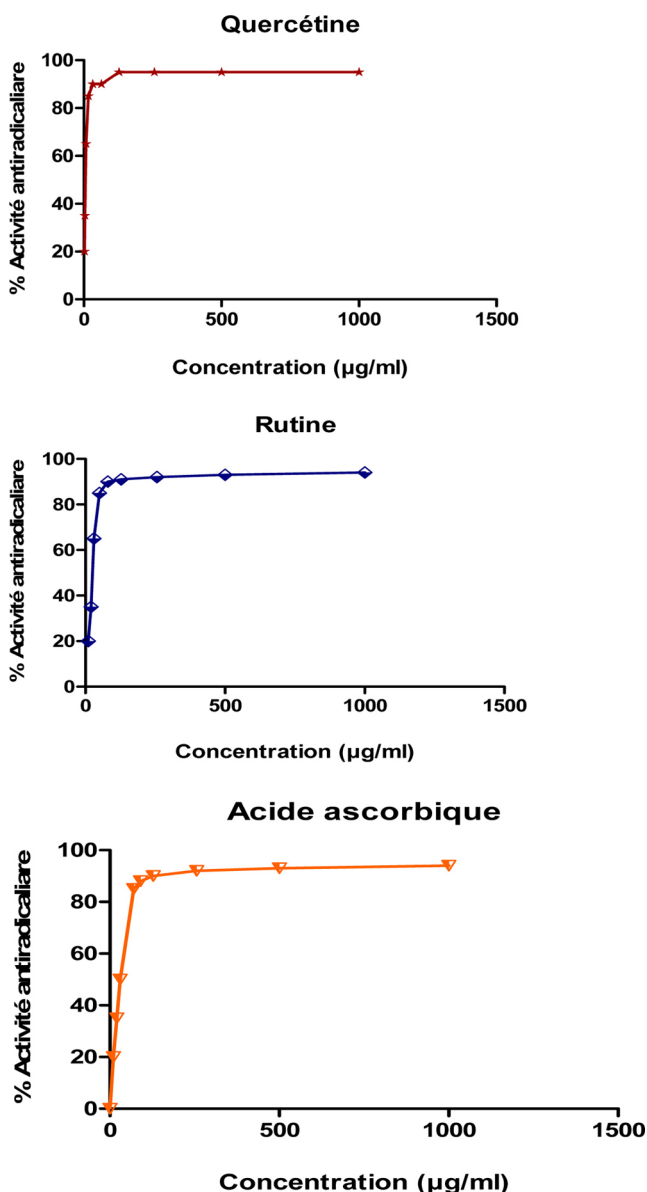


**Fig. 2** Activité antioxydante Relative (AAR) des extraits de *M. deserti* et de l' $\alpha$ -tocophérol dans le système acide linoléique/ $\beta$ -carotène

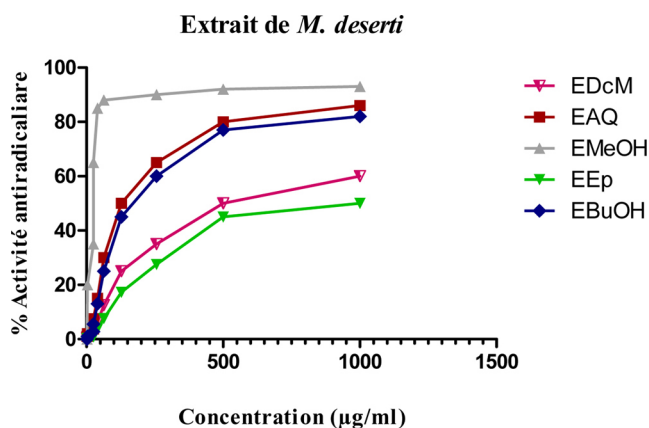
### Effet Scavenger du radical DPPH

L'activité antiradicalaire des différents extraits a été évaluée par leur activité inhibitrice sur une solution méthanolique de DPPH, mesurée à 517 nm. Les standards utilisés étaient la quercétine, la rutine et l'acide ascorbique (vitamine C). L'activité antiradicalaire des différents extraits de *M. deserti* ainsi que les standards a été illustrée dans les Figs 3 et 4.

D'après la Figure 4, on constate que les extraits de *M. deserti* possédant une activité antiradicalaire dose dépendante, les  $IC_{50}$  de chacun des différents extraits ont été déterminées. Selon [27], une valeur plus faible de l' $IC_{50}$  (la concentration du substrat qui cause une inhibition de 50% de



**Fig. 3** Activité antiradicalaire de la quercétine, la rutine et l'acide ascorbique



**Fig. 4** Activité antiradicalaire des extraits de *M. deserti* (chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD)

l'activité de DPPH) indique une activité antioxydante plus élevée. Les standards utilisés montrèrent une activité antiradicalaire puissante avec des  $IC_{50}$  de l'ordre de 0,44  $\mu$ g/ml pour la quercétine ; 1,25  $\mu$ g/ml pour la rutine et 1,45  $\mu$ g/ml pour l'acide ascorbique.

Parmi les cinq extraits de feuilles de *M. deserti*, l'extrait méthanolique représente l'extrait le plus actif avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de 15,1  $\mu$ g/ml suivi par l'extrait aqueux avec une  $IC_{50}$  de 125,2  $\mu$ g/ml. L'activité antiradicalaire de ces extraits pourrait s'expliquer par la présence des composés phénoliques qui sont détectés uniquement dans les extraits polaires. Selon les travaux de Ghedadba et al [28] sur l'espèce *M. vulgare* cette activité est due aux phénylpropanoïdes glycosides. Selon Martin-Nizard et al [29] ces composants sont capables d'inhiber *in vitro* l'oxydation des LDL par le cuivre  $Cu^{2+}$  et un générateur des radicaux libres : le 2,2'-azobis-2-méthylpropionamide (AAPH). En plus, ils préservent l'aspect morphologique de cellules endothéliales d'aorte bovine durant leur incubation avec des LDL modifiées par la myéloperoxydase (effet cytoprotecteur) : baisse de la fuite extracellulaire du lactate déshydrogénase, maintien de l'activité réductrice des mitochondries et réduction de 25 à 40% la libération, par les cellules endothéliales d'aorte bovine, d'*endothéline-1*, peptide à effet vasoconstricteur relargué par les cellules endothéliales. Nos résultats sont en accord avec ceux de Ghedadba et al [28] qui ont prouvé que l'extrait méthanolique de *M. vulgare* d'Algérie s'est avéré pour montrer l'activité antioxydante remarquable dans le balayage de radical DPPH ( $IC_{50} = 1,5 \mu$ g/ml).

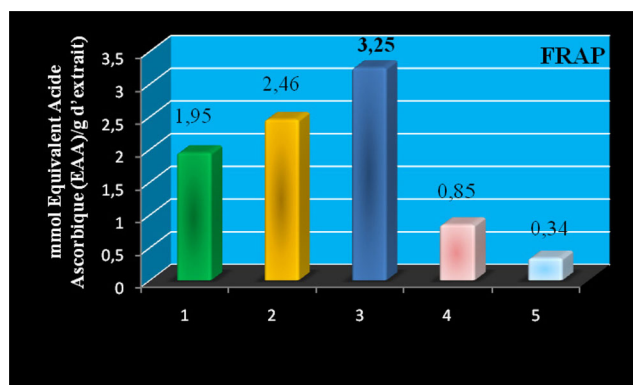
L'extrait dichlorométhanique présente une très faible activité antiradicalaire avec une  $IC_{50}$  500  $\mu$ g/ml, ce qui montre que les antioxydants apolaires sont inactifs vis-à-vis le DPPH. Pour l'extrait étherique, le pouvoir antiradicalaire n'atteint même pas 50%.

### Méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power or Plasma)

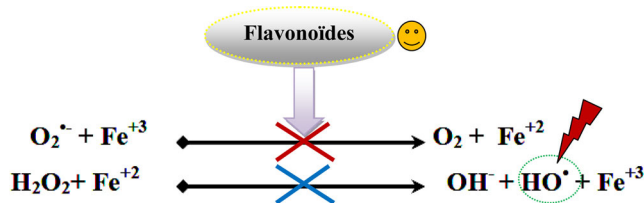
Les radicaux libres sont impliqués dans l'étiologie de bon nombre de désordres métaboliques (hypertension, rhumatismes, cardiopathies, etc.). Dans cette analyse qui est rapide, reproductible et facile, l'activité antioxydante est déterminée par la mesure de la réduction de l'ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en ion ferreux ( $Fe^{2+}$ ). La concentration des composés réducteurs (antioxydants) dans l'extrait est exprimée en mmol Equivalant Acide Ascorbique (EAA)/g d'extrait. Les résultats obtenus ont été illustrés graphiquement (Fig. 5).

D'après la Figure 5, l'extrait méthanolique donne une réduction significative des ions ferriques en ions ferreux de l'ordre de  $3,25 \pm 0,06$  EAA/g en confirmant les résultats des tests de blanchiment du  $\beta$ -Carotène et DPPH, suivi par les deux extraits polaires aqueux ( $2,46 \pm 0,3$ ) et butanolique ( $1,95 \pm 0,015$ ). Cela est interprété par la richesse de ces extraits en composés phénoliques, on peut déduire alors de ce test que les polyphénols notamment les flavonoïdes jouent un rôle très important dans la chélation des métaux de transition impliqués dans la réaction de Fenton (formation de radicaux hydroxyles résultant de la réaction du fer avec le peroxyde d'hydrogène) (Fig. 6).

La complexation des ions métalliques par les polyphénols induit typiquement un déplacement bathochrome de leurs



**Fig. 5** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de feuilles de *M. deserti* par la méthode FRAP (chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD)



**Fig. 6** Réaction de Fenton

bandes d'absorption dans le domaine UV-Visible. Les études menées par Van Acker et al sur la chélation des ions du fer par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques :

- les groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B (les fonctions catéchol),
- les groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C (le motif *énone*),
- les groupes 4-oxo et 5-hydroxy en position 3. Ainsi, la quercétine qui combine tous ces substituants est un complexant métallique particulièrement efficace.

Ce processus d'autoxydation dépend de multiples paramètres tels que la concentration de l'ion métallique et du polyphénol, la température, le pH, la présence d'agents complexants [22].

L'organisme d'un humain adulte possède 4 g de fer dont environ 2/3 sous forme d'hémoglobine (transport de O<sub>2</sub> dans le sang). Dix pourcents supplémentaires sont sous forme de myoglobine (transport de O<sub>2</sub> dans les muscles) et une faible quantité dans plusieurs enzymes contenant du fer (Ex : les mon-oxygénases à cytochromes P<sub>450</sub>). Le fer existe dans l'alimentation sous la forme oxydée Fe<sup>+3</sup>. L'acide chlorhydrique sécrété par la paroi de l'estomac permet sa solubilisation et la vitamine C et/ou les polyphénols de l'alimentation réduisent une partie du Fe<sup>+3</sup> en Fe<sup>+2</sup> et facilitent son absorption. Ils existent des maladies impliquant des anomalies du métabolisme de fer. En dessous du taux optimal, il y a risque d'anémie et au dessus risque de stress oxydant [22].

## Conclusion

Les résultats de ce travail suggèrent l'importance de l'espèce *M. deserti* pour l'usage dans la pharmacie et la phytothérapie. Basé sur cette information, on pourrait conclure que cette plante est l'une des sources naturelles de composés antioxydants et antimicrobiens d'importance élevée. L'analyse qualitative par la CCM a montrée la présence de l'acide gallique, la quercétine, la rutine et trois nouveaux métabolites : l'acide *trans*-cinnamique, l'acide 4-hydroxybenzoïque et le 4-*méthyl*-catéchol. La concentration la plus élevée des composés phénoliques a été obtenue en utilisant des solvants de polarité croissante. L'extrait méthanolique a donné la plus grande valeur en composés phénoliques et en flavonoïdes. Tandis que, l'extrait aqueux a donné la valeur la plus élevée en tanins condensés. Le contenu élevé des composés phénoliques et la corrélation linéaire significative entre les valeurs de la concentration des composés phénoliques et l'activité antioxydante a indiqué que ces composés contribuent à l'activité antioxydante. L'évaluation du pouvoir antioxydant par les trois tests de DPPH, la méthode de blanchiment du β-carotène et la méthode FRAP montre que

l'EMeOH est le plus actif. Les résultats obtenus pour l'activité antimicrobienne montrent que les deux extraits méthanolique et dichlorométhanique sont les plus actifs contre deux souches : *Staphylococcus aureus* (MRSA) et *Escherichia coli*. De plus, l'extrait méthanolique montre une activité plus ou moins importante vis-à-vis la levure *Candida albicans*. Cette activité pourrait être expliquée par la richesse de *M. deserti*, particulièrement l'EMeOH en flavonoïdes. Des études plus approfondies *in vivo* sur l'activité antidiabétique, anti-inflammatoire et antiproliférative seraient nécessaires dans les années à venir pour mieux comprendre le mécanisme d'action des molécules bioactives de cette plante, leur dose thérapeutique ainsi que leur site d'action au niveau de la cellule. Cela permettrait de préparer des produits pharmaceutiques de grand intérêt thérapeutique.

**Liens d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

## Références

1. Uttara B, Singh A V, Zamboni P, et al (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 7: 65–74
2. Moon JK, Shibamoto T (2009) Antioxidant assays for plant and food components. *J Agr Food Chem* 57: 1655–66
3. Edziri H, Mastouri M, Aouni M, et al (2012) Polyphenols content, antioxidant and antiviral activities of leaf extracts of *Marrubium deserti* growing in Tunisia. *South Afr J Botany* 80:104–9
4. Chebrouk F, Hadj-Mahammed M (2009) Composition des huiles essentielles de *Marrubium deserti* de Noé de la région de Ghar-daia. *Ann Faculté Sci Sciences de l'Ingénieur* 1: 75–81
5. Dendougui H, Seghir S, Belloum Z, et al (2011) A new labdane diterpene and other constituents from *Marrubium deserti* Noe ex coss. *Rec Nat Prod* 5(4): 300–4
6. Bellakhdar J (1997) La pharmacopée marocaine traditionnelle: médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press, 764 p
7. Hammiche V, Maiza K (2006) Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol* 105: 358–67
8. Zaabat N, Darbour N, Bayet C, et al (2010) Étude préliminaire de *Marrubium deserti* de Noé, une Lamiaceae endémique Algérienne. *Phytothérapie* 1–6
9. Zaabat N, Hay A E, Michalet S, et al (2011) Antioxidant and antigenotoxic properties of compounds isolated from *Marrubium deserti* de Noé. *Food and Chemical Toxicology* 1-8 pp
10. Karioti A, Heilmann J, Skaltsa H (2005) Labdane diterpenes from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Phytochem* 66: 1060–6
11. Stulzer HK, Tagliari MP, Zampirolo JA, et al (2006) Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *J of Ethnopharmacol* 108(3): 379–84
12. Rigano D, Aviello G, Bruno M, et al (2009) Antispasmodic effects and structure-activity relationships of labdane diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. *Libanoticum*. *J Nat Prod* 72: 1477–81
13. Diallo D, Sanogo R, Yasambou H, et al (2004) Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* (Rhamnaceae),

- utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. C.R. Chimie 7: 1073–80
14. Aliyu AB, Musa AM, Abdullahi MS, et al (2011) Phytochemical screening and antibacterial activities of *Vernonia ambigua*, *Vernonia blumeoides* and *Vernonia ocephala* (Asteraceae). Acta Poloniae Pharmaceut Drug Res 68: 67–73
  15. N'Guessan K, Kadja B, Zirih GN, et al (2009) Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). Sci Nat 6 1–15
  16. Wong SP, Leong LP, William-Koh JH (2006) Antioxidant activities of extracts of selected plants. Food Chem 99: 775–83
  17. Bahorun T, Gressier B, Trotin F, et al (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. Arznein Forsch/ Drug Res 1–6
  18. Julkunen-Titto R (1985) Phenolic constituent in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. J Agricult Food Chem 33: 213–7
  19. Choi YM, Noh DO, Cho SY, et al (2006) Antioxidant and antimicrobial activities of Propolis from several regions of Korea. LWT 39: 756–61
  20. Kartal N, Sokmen M, Tepe B, et al (2007) Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L using a suitable extraction procedure. Food Chem 100: 584–9
  21. Sanchez-Moreno C (2002) Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Internat J Food Sci Technol 8: 121–37
  22. Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reactions-antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn J Nutr 44: 307–15
  23. Rigano D, Formisano C, Basile A, et al (2007) Antibacterial activity of flavonoïds and phenylpropanoïds from *Marrubium globosum* ssp. Libanoticum. Phytother Res 21: 395–7
  24. Stanković MS (2011) Total phenolic content, flavonoïd concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L extracts. Kragujevac J Sci 33: 63–72
  25. Djeridane A, Yousfi M, Brunel JM, et al (2010) Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. Food Chem Toxicol 48: 2599–2606
  26. Cushnie TPT, Lamb AJ (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoïds. Internat J Antimicrob Agents 1–9
  27. Kadri A, Zarai A, Békir A, et al (2011) Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L essential oil from Tunisia. Afr J Biotechnol 10(19): 3908–14
  28. Ghedadba N, Bousselsela H, Hambaba L, et al (2014) Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. Phytothérapie 12: 15–24
  29. Martin-Nizard F, Sahpaz S, Furman C, et al (2003) Natural phenylpropanoïds protect endothelial cells against oxidized LDL induced cytotoxicity. Planta Med 69: 207–11