

Remerciements

En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Nous souhaitant adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire. Ces remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté Sciences de la Nature et de la Vie, Juridiques et sociales, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Nous tenant à remercier sincèrement Monsieur TIGHILT Karim, Directeurs de mémoire, se sont toujours montrés à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'ils ont bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Nous tenons à saisir cette occasion et adresser nos profondes reconnaissances à tous nos éminents professeurs, en particulier le professeur KADRI et madame BEN ISMAIL et nous tenant à remercier sincèrement MAMERI Amel pour leur aide et encouragement au cours de la réalisation ce modeste travail.



Dédicaces

Louange à Dieu, le Tout Puissant, qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce travail aux personnes les plus chères au monde :

À mes très chers parents et mon deuxième père MESSLEM Djellali,

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter. En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie. Avec toute ma tendresse.

À mon cher époux ZOUBIRI Moustapha,

Je vous remercie pour votre soutien, votre patience à mon égard. Tout simplement un grand merci pour votre grand amour, votre patience, vos encouragements.

À mes chers sœurs Maroua et Widad et mes cousine DJEDDI Sarah et Fadia,

Qui me font oublier tous mes soucis avec leurs douces a rôles et leur charmant sourire enfantin. Merci pour votre amour sans limite.

À toute la Famille MOUSSOUS et DJEDDI et surtout ma tante Zahiya.

Merci pour vos conseils, votre soutien, vos encouragements et surtout vos bénédictions et votre amour.

Spéciale dédicace à toutes mes chers amies surtout BRAHIMI Nour Elhouda, ZAROUKI Hadjer, MESSLEM Nadjet et bien sur ma copine Chaima.

À tous ceux qui me sont chers avec un très spéciale dédicace a mon oncle BRAHIMI Rabeh Pour toute leur aide et motivation dans ma carrière.

Khadija



Dédicaces

Aux êtres les plus chers au monde « Mes parents » pour tous les efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris afin de me voir réussir. Je les remercie pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué, pour leur présence permanente, leur affection, leur disponibilité et pour tout le mal qu'ils se donnent pour moi.

À mon cher mari de m'avoir soutenu dans ma carrière d'éducation et pour tous les efforts et sacrifices qu'il a fait pour moi

À mon cher fils Anas

À mon chère sœur " Lydia ".

À mes chers frères " Ihab et Mohamed ".

À toute ma famille et mes proches.

À toute mes amies "Hoda, Khadidja, Souad, Hafida, Iman, Rahma.....".

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

À tous ceux qui me sont chers.

Chaima



Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Annexe

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : *Marrubium vulgare L*

I.1 Caractéristiques botaniques 3

I.2 Classification botanique et taxonomie 3

I.3 Nomenclature 4

I.4 Distribution géographique 4

I.5 Composition biochimique 5

I.6 Propriétés médicinales du Marrube blanc 7

Chapitre II : Le stress oxydant et les antioxydants

II.1. Généralités 9

II.2. Les radicaux libres 9

II.2.1. Définition..... 9

II.2.2. Principaux radicaux libres et leurs origines..... 10

II.2.2.1. Espèce réactives dérivées de l’oxygène..... 10

II.2.2.2. Espèce libre non oxygénées..... 11

II.2.3. Rôles des radicaux libres 11

II.3. Le stress oxydant 12

II.3.1. Définition.....	12
II.3.2.Origine du stress oxydant.....	12
II.3.3. Les conséquences du stress oxydant.....	13
II.4. Les antioxydants	13
II.4.1. Définition d'un antioxydant.....	13
II.4.2. Principaux antioxydants	13
A. Les antioxydants endogènes	13
B. Les antioxydants exogènes.....	14
II.4.3. Mécanismes d'actions des antioxydants.....	14
II.4.4. Evaluation de la capacité antioxydant par des tests in vitro	15
II.4.5.Utilisations des antioxydants	15

Chapitre III : Le brunissement enzymatique

III.1. Définition	16
III.2. Réactions du brunissement enzymatique	16
III.3. Localisation des composés phénoliques et des enzymes d'oxydation	17
III.4. Les enzymes du brunissement enzymatique	18
III.4.1.Polyphénoloxydase.....	19
III.4.1.1. Nomenclature	19
III.4.1.2. Mécanisme réactionnel et substrats	19
III.4.2. Peroxydase	21
III.4.2.1. Nomenclature	22
III.4.2.2. Mécanisme réactionnel et substrats	23
III.5. Contrôle et prévention du brunissement enzymatique	23
III.5.1. Méthodes physiques	24
III.5.2. Méthodes chimiques.....	24

Étude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal	27
I.2. Extractions organique et aqueuse.....	27
I.2.1. Préparation de la poudre végétale	27
I.2.2. Préparation des extraits de feuilles et de tiges	27
I.2.3. Calcul du rendement	28
I.3. Dosages des composés phénoliques.....	28
I.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	28
I.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	29
I.3.3. Dosage des flavonols	30
I.3.4. Dosage des tannins	30
I.4. Évaluation du pouvoir antioxydant des extraits de marrube.....	30
I.4.1. Test du DPPH	30
I.4.2. Test du radical ABTS ⁺	32
I.4.3. Test de réduction du fer	33
I.4.4. Test de β carotène	34
I.5. Mesure de l'activité anti-enzymatique.....	34
I.5.1. Mesure de l'activité anti-péroxydase	35
I.5.2. Mesure de l'activité anti-polyphénoloxydase	36
I.6. Analyse statistique	36

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Taux d'extraction	37
II.2. Dosages colorimétriques des extraits	38
II.2.1. Taux des polyphénols totaux	38

II.2.2. Taux des flavonoïdes	39
II.2.3. Taux des flavonols.....	41
II.2.4. Taux des tannins	42
II.3. Activité antioxydante.....	43
II.3.1. Activité scavenging du radical DPPH	43
II.3.2. Activité scavenging du radicale ABTS	46
II.3.3. Test de la réduction du fer	47
II.3.4. Test de β carotène.....	49
II.4. Relation entre les différentes activités antioxydantes.....	51
II.5. Activité anti-enzymatique.....	52
II.5.1. Activité anti-peroxydase.....	52
II.5.2 Activité anti-polyphénoloxydase	54
Conclusion.....	57
Références bibliographiques	

Liste des abréviations

- ABTS** : Acide 2,20-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-sulphoonique)
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AlCl3** : Trichlorure d'Aluminium
- BHA** : Butyl Hydroxyanisol
- BHT** : Butyl Hydroxytoluène
- CAT** : Catalase
- DPPH** : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
- EAG** : Équivalent en Acide Gallique
- EQ** : Équivalent en Querciténe
- ERO** : Espèces réactives d'oxygène
- HCl** : Acide chlorhydrique
- OH°** : Le radical libre hydroxyle
- O2** : Oxygène singulier
- UV/Vis** : Ultraviolet/Visible
- POD** : Peroxydase
- PPO** : Polyphénoloxydase
- SOD** : Superoxydes dismutases
- Rpm** : Rotation par minute

Liste des figures

Figure 1 : Aspects morphologiques du <i>Marrubium vulgare L</i>	4
Figure 2 : Structure de quelques molécules présentes chez le <i>Marrubium vulgare L</i>	5
Figure 3 : Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde	11
Figure 4 : Réactions enzymatiques du brunissement	17
Figure 5 : Localisation des composés phénoliques et des enzymes d'oxydation	18
Figure 6 : Réactions catalysées par les polyphénolases	20
Figure 7 : Les étapes de formation des mélanines brunes: (a) hydroxylation secondaire de l'o-quinone ; (b) formation des hydroxyquinones.....	21
Figure 8 : Réduction des quinones par l'acide ascorbique	25
Figure 9 : Réaction de chélation de trichlorure d'aluminium avec les flavonoïdes.....	29
Figure 10 : Structure et spectre d'absorbance UV/Vis du radical DPPH• et de sa forme réduite DPPH	31
Figure 11 : Formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un donneur de H [•]	32
Figure 12 : Réduction du fer ferrique en fer ferreux par un antioxydant (AH).....	33
Figure 13 : Oxydation du gaïacol en tetragaiacol.....	35
Figure 14 : Teneur en polyphénols totaux des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles et tiges de marrube.....	39
Figure 15 : Teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de marrube.....	40
Figure 16 : Taux des polyphénols (mg EAG/g MS) et flavonoïdes (mg EQ/g MS) des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles et des tiges de marrube.....	41

Figure 17 : Teneur en flavonols des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de marrube.....	42
Figure 18 : Teneur en tanins condensée des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de marrube.....	42
Figure 19 : Activité antiradicalaire DPPH des extraits de <i>Marrubium vulgare</i> (chaque valeur représente la moyenne de trois essais) pour une concentration de 1 mg/ml.....	44
Figure 20 : Concentrations responsables à 50% d'inhibition du radical DPPH• (IC 50) avec des concentrations des extraits de 1mg/ml et de standard de 0.01 u g/ml.....	45
Figure 21 : Pouvoir réducteur des extraits méthanolique et aqueux de marrube. Les extraits de marrube à 1 mg/ml.....	47
Figure 22 : IC 50 du pouvoir réducteur des extraits méthanolique est aqueux des feuilles et de tiges de marrube. Les résultats sont la moyenne de 3 essais, avec des concentrations de 1mg/ml des extraits et de 0.1ug/ml de standard.....	48
Figure 23 : Cinétique de blanchiment du β -carotène en présence des extraits de <i>M.vulgare</i> et de standard (BHA avec une concentration de 0.1u g/ml.....	49
Figure 24 : IC 50 du radical β -carotène des extraits méthanolique est aqueux des feuilles et de tiges de marrube.....	50
Figure 25: Variation de l'absorbance en fonction du temps de gaiacoquinone en présence et en absences des extraits méthanoliques de marrube à 500 μ g /ml.....	53
Figure 26: Variation de l'absorbance en fonction du temps de gaiacoquinone en présence et en absences des extraits aqueux de marrube à 500 μ g /ml.....	53
Figure 27: Variation de l'absorbance en fonction du temps de l'activité des polyphénoxydases en présence et en absences des extraits aqueux de marrube à 500 μ g /ml.....	55

Liste des tableaux

Tableau I : Quelques métabolites identifié chez <i>Marrubium vulgare L</i>	6
Tableau II : Principale composés phénoliques identifiés dans la fraction Ethanolique de <i>Mrrubium. Vulgare L</i>	7
Tableau III : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologique	10
Tableaux IV: Taux d'extraction par macération des feuilles et tiges de <i>Marrubium vulgare L.</i>	37
Tableau V : Pourcentages d'inhibition de peroxydation lipidique (%IPL), les concentrations responsables à 50% d'inhibition du radical ABTS des extraits de feuilles et de tiges du marrube.....	46
Tableau VI : Coefficients de corrélation entre polyphénols, flavonoïdes, DPPH, ABTS, pouvoir réducteur, et B-carotène des extraits méthanoliques et aqueux de <i>Marrubium vulgare</i>	51
Tableau VII : Taux d'ihnibition des PPO par les extraits de <i>Marrubium vulgare</i> à 500 µg/ml.....	55

Introduction

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. Les effets bénéfiques des plantes aromatiques et médicinales sont connus depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (**Bouzouita et al, 2008**).

Le premier texte sur la médecine par les plantes a été gravé sur des plaques d'argile par les Sumériens, environ 3 000 ans avant Jésus-Christ. Ils utilisaient des plantes telles le myrte, le chanvre et le thym.

En application pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire, la valorisation et l'industrialisation des substances d'origine végétale sont en plein essor. Cet intérêt accru pour ces substances est lié surtout à leurs propriétés d'antioxydants et/ou d'anti-enzymatiques. En santé humaine, il est communément admis que de nombreuses pathologies telles que le vieillissement, les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires (Athéroscléroses), cancers et les maladies inflammatoires sont directement ou indirectement, dues à un déséquilibre dans la balance existant au niveau physiologique entre les radicaux oxygénés et les antioxydants (enzymatiques ou non enzymatiques) suite à un stress oxydatif (**Di Matteo., et al, 2003**).

Ce déséquilibre en faveur des espèces oxygénées engendre des dommages au niveau cellulaire, qui se traduit par des pathologies pouvant être létales. Afin, de faire face à ces pathologies dues en partie à ces radicaux, des composés antioxydants de synthèses tels que le butyle d'hydroxy-toluène (BHT) et le butyle d'hydroxy-anisole (BHA) sont utilisés comme principes actifs. Malgré, les résultats encourageants obtenus avec ces antioxydants, il est de plus en plus démontré que leurs utilisations est susceptible de manifester des effets secondaires, voire même toxique, notamment une augmentation du risque d'apparition de certaines tumeurs (**Mania., et al, (2008)**).

Dans l'optique de valoriser des substances végétales en application pharmaceutique, cosmétique ou agroalimentaire s'inscrit l'objectif de notre travail de recherche qui consiste à la valorisation des substances actives de la flore Algérienne particulièrement les plantes du genre *marrubium* qui sont largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de

plusieurs pathologies, telles que :les troubles digestifs, la perte de l'appétit et la dyspepsie. Elle est également employée comme anti nociceptif, antihypertenseur, antispasmodique, analgésique, insecticide, anti-inflammatoire antimicrobien, antioxydant antifongique anti leucémique et dans de nombreuses autres activités biologiques (Alkhatib., *et al*, 2010).

Pour réaliser notre objectif, nous avons choisi les feuilles et les tiges de l'espèce *Marrubium vulgare L* de la région de Bouira à comme sources d'extraits pour évaluer leurs activités antioxydants et antienzymes du brunissement (anti-péroxydase et anti-polyphénoloxydase). Les résultats obtenus sont décrits dans ce manuscrit qui comporte : Une synthèse bibliographique constituée de trois chapitres : le *Marrubium vulgare L* et leurs intérêts thérapeutiques ; Le stress oxydatif, le système de défense antioxydant et les antioxydants du marrube ; et le brunissement enzymatique.

Une partie expérimentale décrivant la méthodologie réalisée et les résultats obtenus : dosage des composés phénoliques des extraits aqueux et méthanoliques, évaluation de l'activité antioxydant par tests DPPH, ABTS, blanchiments de β -carotène et FRAP et évaluation de l'activité anti-péroxydase et anti-polyphénoloxydase de ces mêmes extraits de *Marrubium*.

I.1 Caractéristiques botaniques

Le Marrube vulgaire est une herbacée vivace assez commune dans la région méditerranéenne, de 30 à 80 cm de hauteur, à odeur de thym au froissement, d'aspect blanchâtre très rameux, à poils laineux appliqués, à petites feuilles en coin à la base et portant quelques dents au sommet, fleurs en petites glomérules à l'aisselle des paires de feuilles, corolle petite par rapport au calice tubuleux, celui-ci s'accroissant considérablement par sa partie supérieure en formant autour du fruit une auréole membraneuse (**Bensalah, 2014**).

Les feuilles de Marrube ont une odeur modérément forte du type aromatique mais pas agréable qui par séchage est améliorée et en gardant quelques mois est en grande partie dissipée leur goût est très amer pénétrant et durable dans la bouche (**Woodville, 1810**).

On la retrouve surtout sur les bords des chemins, dans les prés secs, des lieux incultes, des décombres et des terrains vagues. On la distingue des autres plantes par leurs odeurs proches de celle de thym (**Bensalah, (2014)**).

I.2 Classification botanique et taxonomie

Selon **Judd, (2002)** l'espèce *Marrubium vulgare* est classé comme suite :

Règne	Végétale (Plantae).
Embranchement	Angiosperme.
Classe	Eudicotylédones(Magnoliopsida).
Sous-classe	Gamopétale.
Ordre	Lamiales.
Famille	Lamiacées (menthes).
Genre	Marrubium (marrube).
Espèce	<i>Marrubiumvulgare L.</i>



Figure 1 : Aspects morphologiques du *Marrubium vulgare L* (Woodville, 1810).

I.3 Nomenclature

Cette plante est connue sous le nom latin du *Marrubium vulgare L*. Au Maghreb, elle porte plusieurs noms, en Algérie elle est connue sous le nom Marriouth, au Maroc : Merrîwtet et en Tunisie sous le nom de Marroubia (Quézel., et al, 1963).

Nom Kabyle : Marouyeth

Nom Arabe : Merriwa, Marryout

Nom Français : Marrube blanc, marrube commun, marrube vulgaire

Nom Anglais : White horehound, hoarhound, andorn

Selon **Bonnier, (1909)**, Le terme le marrube provient de deux mots hébreux « mar et rob », signifiant "suc amer". Le nom « marrube » désigne une plante amère, utilisée par les juifs dans leurs fêtes.

I.4 Distribution géographique

Elle pousse dans toute l'Afrique du Nord et presque dans toute l'Europe, au centre et au Sud-ouest de l'Asie et aux Canaries. Elle est naturalisée dans l'Amérique du Nord et dans l'Amérique du Sud (**Bonnier, 1909**).

I.5 Composition biochimique

Cette espèce est très riche en différents métabolites secondaires, on y trouve des diterpènes amers de la série des furanolabdanes et surtout des composés de lactone, marrubiine qui est le composé responsable de la majorité des propriétés biologiques de cette plante (figure 2), ainsi que prémarrubiine, du pérégrinol, du vulgareol, du marrubénol et du marrubiol (Paolini, 2008).

On trouve également des hétérosides flavoniques, quercétol, lurtéoline ou de l'apigénine, des lactoylflavones, et quelques dérivés de l'acide ursolique, qui sont des métabolites de la famille de flavonoïdes, ainsi que plusieurs phénylpropanoïdes esters tels que les verbascosides (Paolini, 2008).

En outre il y a des tanins spécifiques des lamiacées et dérivés de l'acide hydroxycinnamique (juste à 7%) (Acide chlorogénique, caféique, caféylquinique, mais absence d'acide rosmarinique). Toutefois la présence d'une faible quantité d'huiles essentielles comportant environ 50 composés (en ce qui concerne les composants dominants, quels taux dépassaient 1% du total composition de l'huile, neuf composants parmi les cinquante ont été au moins déterminés avec une suprématie de trois composants principaux: 4,8,12,16-Tetramethylheptadécane-4-olide (16,97%), germacrène D-4-ol (9,61%), α -pinène (9,37%) (Abadi, 2013).

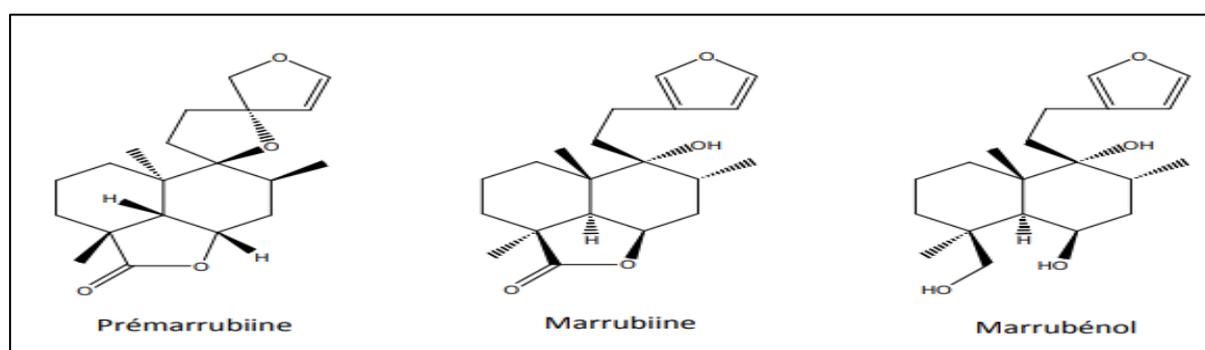


Figure 2 : Structure de quelques molécules présentes chez le *Marrubium vulgare L*.

L'analyse des compositions des extraits de *Marrubium vulgare L* par a révélé la présence de trente-quatre métabolites (tableau I), tous appartenant à la classe des polyphénols. En particulier, des flavonoïdes ont été détectés, en même temps que l'acide 5-caféoylquinique (chlorogénique). Le tableau suivant représente les différents métabolites identifié chez *Marrubium vulgare L*.

Tableau I: Quelques métabolites identifié chez *Marrubium vulgare L*, (Boudjelal A., Henchiri C., et al. 2012).

Composés	Composés
Geshoidin	Garcinone E
Decaffeoylverbascoside	Luteolin
Sacranoside A	Premarrubiin
Acide caféique	Terniflorin
Marruboside	Premarrubiin
Forsythoside B	Deacetylforskolin
Verbascoside	Terniflorin
Luteolin-Oglucoside	Marrulibacetal A
Alyssonoside	Apigenin
Leukoceptoside A	Anisofolin A
Apigenin-Oglucoside	Marrubenol
Preleosibirin	Terniflorin
Garcinone E	

Alor que, **Boudjelal., et al, 2012**) ont montré que les extraits ethanologique de *Marrubium vulgare L*. contiennent treize composés phénoliques (tableau I).

Les recherches effectuées par **Boudjelal ., et al, (2012)** sur les extraits aqueux de cette espèce ont permet de révéler l'existence de 50 métabolites, dont la majorité de ces composés sont de classe des polyphénols et particulièrement sept flavonoïdes.

Tableau II : Principale composés phénoliques identifiés dans la fraction Ethanolique de *Mrrubium. Vulgare L*, (Boudjelal ., et al, 2012)

N°	Composés
01	Acide caféique
02	Acide syringique
03	Acide sinapique
04	Acide férulique
05	Acide 2-hydroxycinnamique
06	Luteolin-7-O--d-glucoside
07	Acide rosmarinique
08	Quercetin-3-d-galactoside
09	Quercetin-3--d-glucoside
10	Kaempferol-3-glucoside
11	Acide trans- Cinnamique
12	Apigenin
13	Acide coumarique

I.6 Propriétés médicinales du Marrube blanc

Marrubium vulgare était connue depuis très longtemps pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine. Les anciens égyptiens l'utilisent comme insectifuge et comme antidote contre les poisons. Les grecs l'utilisent contre les morsures des chiens enragés ainsi que pour soigner la tuberculose, l'asthme et la toux (Larousse, 2001).

Cette espèce est traditionnellement utilisée dans le traitement symptomatique de la toux et au cours des affections bronchiques aiguës et bénignes. Selon la Commission allemande (Commission européenne), le marrube est utilisé dans le traitement des dyspepsies et la perte d'appétit (Raynaud, 2007). Elle est également traditionnellement utilisée pour le traitement de divers maux : sifflements respiratoires, maladies urinaires, otites et ophtalmies (Bellakhdar, (1997).

En Algérie elle est employée couramment dans la médecine traditionnelle contre la diarrhée, le diabète, le rhumatisme, le rhume et les douleurs respiratoire (Belhattab., et al, (2006).

Marrubium vulgare, est une plante riche en tanins et en composés réducteurs avec présence aussi d'alcaloïdes, de coumarines, de terpénoïdes, de stérols et de triterpènes, ce qui explique son utilisation dans le traitement des difficultés respiratoires, des bronchites, des bronchectasies, des bronchites asthmatiformes des toux sèches, de la coqueluche, de diabète et dans certaines infections de la peau **(El Alami., et al, (2016).**

Sur le plan pharmacologique, on lui reconnaît des propriétés antioxydantes, hypoglycémiantes), et antidiabétiques, analgésiques, et anti-inflammatoires **(Vergara-Galicia., et al, 2012).**

Cette espèce possède également des effets hypolipidémiant, vasorelaxant et anti-hypertension, anti-cholinestérase contre l'acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase. Il possède les activités tonique, aromatique, stimulante, expectorante, diaphorétique et diurétique **(Ahmed., et al, 2008)**

II.1. Généralité

Radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public.

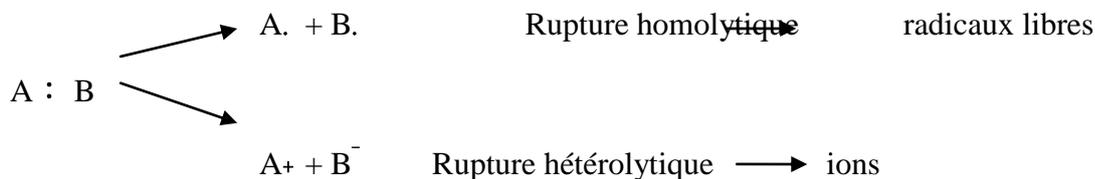
Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, **Gerschman** puis **Hartman** évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement. En 1969, les Américains **McCord** et **Fridovich** isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la superoxydedismutase (SOD), démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**)

II.2. Les radicaux libres

II.2.1. Définition

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié. De par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner sa stabilité. Cet électron leur confère des propriétés physico-chimiques particulières (**Lehucher., et al, 2001**).

Ces radicaux peuvent se former par transferts mono-électroniques ou par scission homolytique de liaison covalente selon le schéma suivant :



Après une rupture homolytique, chacun des deux électrons intervenant dans la liaison entre les atomes A et B gagne l'orbitale externe de ces atomes, qui deviennent alors des radicaux libres (**Bonnefont-Rousselot., et al ,2003**).

II.2.2. Principaux radicaux libres et leurs origines

Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Les sources des radicaux libres sont nombreuses. Il existe trois grandes voies de formation de ces derniers **Turrens., et al,1985**).

Chimique (agent oxydant ou des catalyseurs chimiques)

- **Photochimique** (rayonnement) il y a une autre petite voie appelé ;
- **Biologique** (catalyseurs enzymatiques)

II.2.2.1. Espèce réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme (**Bouhadjra, 2011**)

A. Radical libre hydroxyle : OH° : Le radical libre hydroxyle (OH°) est très réactif ; il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésion de nécrose. C'est un dérivé de l'ion superoxyde. Il peut être produit à la suite de diverses réactions.

B. Oxygène singulier : O₂ : Lorsque l'énergie apportée à l'oxygène est nécessaire, celui-ci passe à l'état singulier qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :



Cette voie nécessite l'énergie qui pourra être fournie par les radiations ionisantes, par la lumière, la chaleur et les ultrasons.

Tableau III : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (**Lounassi, 2013**).

Espèce radicalaire		Espèce non radicalaire	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	O ₂ [°]	Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Radical hydroxyle	OH [°]	Acide hypochlorique	HOCL

Monoxyde d'azote	NO°	Oxygène singulier	O_2
------------------	-------------------	-------------------	--------------

II.2.2.2. Espèce libre non oxygénées

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO).

Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs.

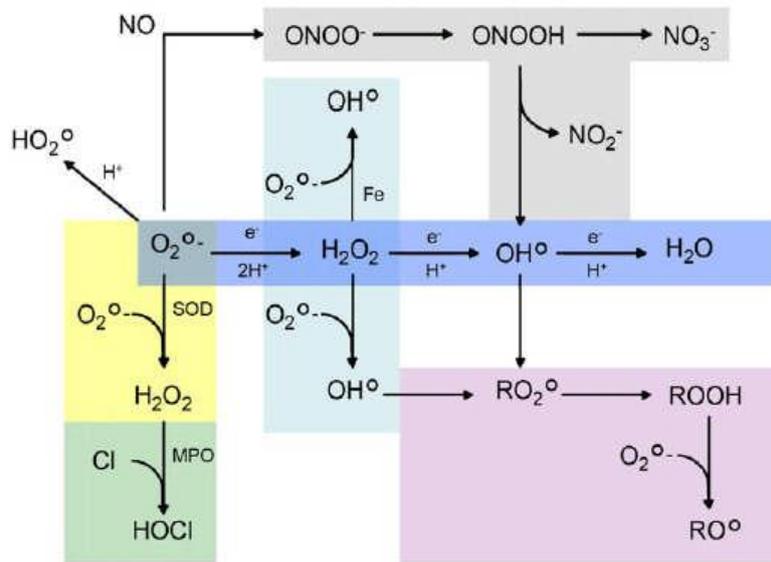


Figure 3 : Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

II.2.3. Rôles des radicaux libres

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui à part la phagocytose, ont été découvertes récemment.

Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de

l'ovule, à la régulation des gènes (**Favier, 2003**), à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire.

II.3. Le stress oxydant

II.3.1 Définition

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence et en faible quantité et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant (**Favier, 2003**).

Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant selon ses habitudes alimentaires, son mode de vie, ses caractéristiques génétiques ou l'environnement dans le quel il vit (**Diallo, 2005**). L'importance des dommages du stress oxydant dépend de la cible moléculaire, de la sévérité de l'effort et du mécanisme par lequel l'effort oxydant est imposé (**Aruoma, 1999**).

II.3.2. Origine du stress oxydant

Cette rupture d'équilibre, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines. L'organisme peut avoir à faire face à une production beaucoup trop forte pour être maîtrisée, qui sera observée dans les intoxications aux métaux lourds, les ischémies/reperfusions suivant des thromboses, le dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale ; l'activation de systèmes enzymatiques ; la libération de fer libre à partir des protéines chélatrices ou d'une oxydation de certaines molécules (**Pincemail, et al, 2002**).

Les radicaux libres sont produits pendant l'irradiation, par la lumière UV, par rayons X et par les rayons γ , sont des produits des réactions métal-catalysées ; sont présent comme des polluants dans l'atmosphère ; sont produits par des neutrophiles et des macrophages pendant l'inflammation ; sont des sous-produits des réactions mitochondrie-catalysées de transport d'électron et d'autres mécanismes (**Valko., et al, 2006**).

L'ingestion d'alcool est suivie par la formation de radicaux libres, également des antibiotiques, des anticancéreux. L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme. Enfin, une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant (**Pincemail., et al, 2002**).

II.3.3. Les conséquences du stress oxydant

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression (**Favier, 2003**).

II.4. Les antioxydants

II.4.1. Définition d'un antioxydant

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autre substrat oxydable et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (**Ibrahim, 2013**).

II.4.2. Principaux antioxydants

A. Les antioxydants endogènes

La production physiologique d'ERO, est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (superxoydedismutase, la catalase, glutathion peroxydase, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine, ...).

Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADNendonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la

cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (Pincemail, *et al*, 2002)..

B. Les antioxydants exogènes

➤ **Médicaments** : Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihyperlipoprotéïnémiques, les bêta-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés anti-oxydantes.

➤ Antioxydants naturels

1- **Vitamine C** : On les trouve à profusion dans les fruits et les légumes. Utilisé comme antioxydant de synthèse dans les industries alimentaire.

2- **Vitamine E ou tocophérol** : Prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes. Elle est présente dans les matières grasses comme l'huile.

3- **Le sélénium** : Les effets bénéfiques de cet oligo-élément sur l'organisme ne sont connus que depuis un quart de siècle. Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure). Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers.

4- **Le β-carotène** : Autre l'activité pro vitaminique A, possède la capacité de capter l'oxygène singulier.

5- Les composées phénoliques

5-1 Les flavonoïdes : Les relations structure-activités anti-oxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité anti-oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation.

5-2 Les tanins : Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation.

5-3 Les coumarines : Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes.

5-4 Les phénols : Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir propriétés des antivirales (Diallo, 2005).

II.4.3. Mécanismes d'actions des antioxydants

Il y a deux options pour retarder la réaction d'oxydation :

- ❖ Soit intercepter les radicaux libres responsables de la réaction en chaîne ;
- ❖ Soit éviter la décomposition des hydroperoxydes dans les radicaux libres.

Ces deux options fournissent la base de classification des antioxydants sous forme primaire ou secondaire selon leur mécanisme d'action (**Ibrahim., et al, 2013**).

II.4.4. Evaluation de la capacité antioxydant par des tests in vitro

Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes : par transfert d'électron singulier ou par transfert d'atome d'hydrogène. Les méthodes ABTS (TEAC) et DPPH jouent sur le transfert l'électron singulier, alors que la méthode ORAC joue sur le transfert d'atome d'hydrogène.

II.4.5. Utilisations des antioxydants

On peut utiliser les antioxydants dans plusieurs domaines comme suivants :

- Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation ;
- Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras ;
- Dans *l'industrie* teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lourd lors de la teinture (**Ibrahim., et al, 2013**).

III.1. Définition

Le brunissement consiste en un changement de coloration au cours du vieillissement des aliments frais ou pendant la mise en œuvre des différents procédés de fabrication ou de conservation (**Vámos-Vigyázó., et al, 1981**).

Chez les végétaux, ces réactions qu'elles soient catalysées ou non par des enzymes, ne sont généralement pas souhaitables, car elles nuisent fréquemment à leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles, menant ainsi à des pertes économiques considérables pour de nombreux produits (**Lee., et al, 1995**).

On appelle brunissement enzymatique la transformation par l'intermédiaire d'un système enzymatique spécifique de composés phénoliques en polymères colorés plus souvent bruns ou noirs. Les pigments sombres formés sont désignés par le terme général de mélanines par opposition au brunissement de Maillard qui est de type non enzymatique (**Walker., et al, 1998**).

III.2. Réactions du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique peut avoir lieu lors de la croissance des fruits et légumes ou durant l'endommagement mécanique lors du traitement et des manipulations post récolte, également lors de la conservation et des transformations technologiques (parage, découpage, broyage pour la préparation des jus, déshydratation, conservation au froid et congélation). La formation des pigments bruns n'est cependant pas toujours indésirable ; un certain degré de brunissement est en effet recherché lors de la maturation des fruits secs (dattes, pruneaux et raisins...) (**Fidjel, 2016**).

Ce phénomène se traduit par l'oxydation et la polymérisation des composés phénoliques comme résultat de l'activité enzymatique des polyphénoloxydases (PPO) et/ou des peroxydases (POD) est qui pouvant conduire à la formation de pigments bruns.

Les PPO et la POD sont largement détectées dans de nombreux fruits et légumes et sont étroitement liées au changement de couleur avec la perte conséquente des propriétés sensorielles et de la qualité nutritionnelle (**Robinson, 1991**).

Le produit initial de l'oxydation est habituellement le O-quinone qui est hautement instable, ce dernier subit une polymérisation pour donner des pigments bruns de haut poids moléculaire (figure 4) (Barba., *et al*, 2016).

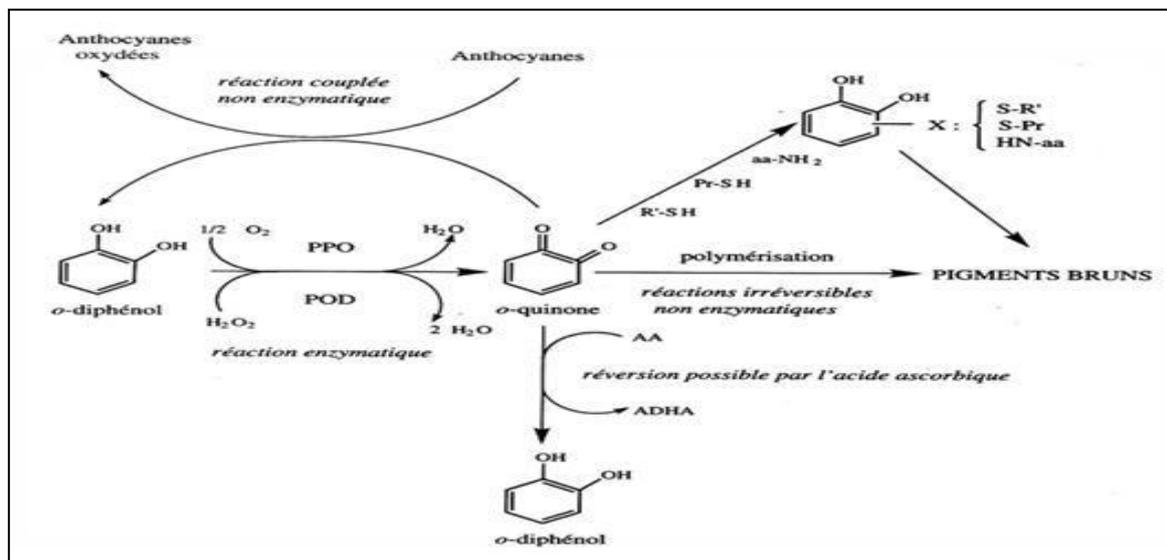


Figure 4 : Réactions enzymatiques du brunissement (Macheix., *et al*, 1990).

III.3 Localisation des composés phénoliques et des enzymes d'oxydation

Les enzymes de brunissement enzymatique sont localisés dans les différents organes de plantes supérieures : feuilles, fruits, fleurs, racine, tiges et organes de réserves. Leur expression varie selon l'espèce et le degré de maturité. Ainsi, dans la pomme immature, on trouve les activités enzymatiques uniformément réparties dans le fruit alors qu'à maturité ces enzymes sont localisées au niveau de la peau et de la pulpe (Macheix, *et al*, 1990). Bien que l'activité de ces enzymes soit généralement retrouvée dans tous les tissus végétaux, le brunissement enzymatique ne se produit pas sur un végétal sain du fait de l'absence de contact entre les enzymes et leurs substrats. En effet, les substrats du brunissement enzymatique, principalement des composés phénoliques solubles, sont stockés dans les vacuoles, alors que les enzymes sont pour la plupart d'entre elles situées dans les organites cellulaires : mitochondries, chloroplastes et cytoplasme ou dans la paroi (figure 5).

Les enzymes du brunissement se trouvent soit sous forme soluble dans le cytoplasme, c'est le cas des PPO des champignons et des végétaux supérieurs, soit sous forme intégrée aux membranes des organites (membranes internes des chloroplastes, des mitochondries et des peroxysomes), c'est le cas des PPO de pomme et d'olive. On les retrouve aussi sous forme

associée aux parois pecto-cellulosiques comme par exemple la PPO de bananes ou à la membrane des graines d'amidon comme c'est le cas de la PPO de la pomme de terre.

Le déclenchement de la réaction du brunissement enzymatique nécessite donc une décompartmentation cellulaire préalable soit par des facteurs naturels au cours de la maturation, soit suite aux attaques du végétal par les micro-organismes ou à l'intervention humaine au cours des traitements des différents processus technologiques (fabrication, transformation, conservation) mettant les enzymes en contact direct avec leurs substrats provoquant ainsi le déclenchement du phénomène du brunissement (Macheix., et al, 1990) .

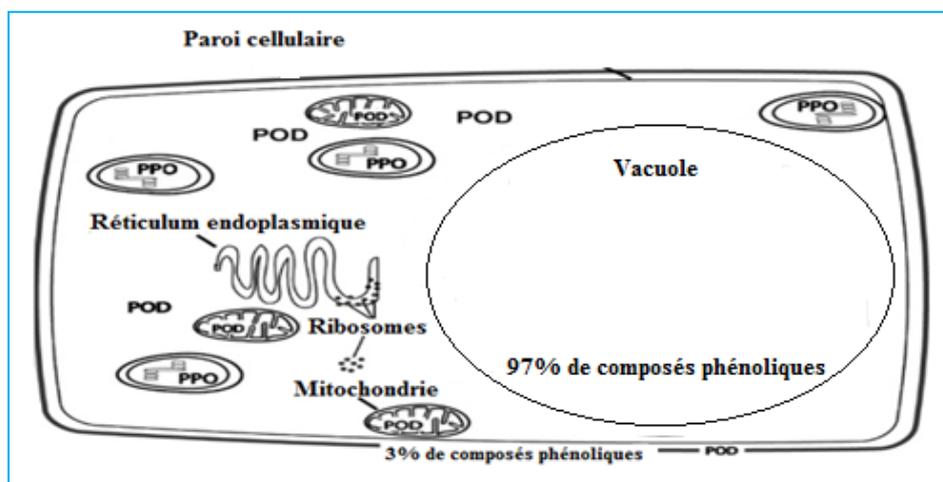


Figure 5: Localisation des composés phénoliques et des enzymes d'oxydation (Toivonen., et al, 2008).

III.4. Les enzymes du brunissement enzymatique

Les enzymes impliquées dans les réactions du brunissement sont soit des polyphénoloxydases (PPO) dont le substrat oxydant est l'oxygène et/ou des peroxydases (POD) où le substrat oxydant est le peroxyde d'hydrogène. À cause de leur haute affinité pour les substrats naturels, la PPO est considérée comme l'enzyme clé du brunissement. L'ampleur de la participation des peroxydases dans le brunissement enzymatique des fruits et légumes est demeurée sujet à controverse, car le peroxyde d'hydrogène est généralement présent à des concentrations très faibles dans les cellules végétales et l'activité peroxydasique est rapidement bloquée par les premières quinones formées par les PPO (Lopez-Serrano., et al, 2002).

III.4.1. Polyphénoloxydase (PPO)

La principale enzyme responsable de la réaction de brunissement est la polyphénoloxydase, même si un effet de synergie possible entre la polyphénoloxydase et la peroxydase a été suggéré (Tomás-Barberán., *et al*, 2001).

III.4.1.1.Nomenclature

La PPO existe sous deux formes avec comme critère de différenciation, la spécificité vis-à-vis des substrats phénolique. Par ailleurs, c'est le terme de polyphénoloxydase qui est généralement utilisé (Walker., *et al*, 1998)

➤ La laccase (EC 1.10.3.2) qui catalyse l'oxydation aussi bien d'*o*- que de *p*-diphénols. Elle est sécrétée en abondance par les champignons au cours de leur croissance (Perry., *et al*, 1993). Cette activité est absente chez les fruits et légumes, bien qu'elle ait été détectée chez la pêche et l'abricot vraisemblablement suite à une contamination bactérienne.

➤ La catéchol oxydase à laquelle on attribue deux types d'activités. L'activité crésolasique, renommée monophénolmonoxygénase (EC 1.14.18.1) qui est capable d'hydroxyler les monophénols en *o*-diphénols ; ces derniers sont alors oxydés en *o*-quinones. L'activité crésolasique est connue depuis longtemps chez les champignons, mais a été détectée plus récemment chez la pomme de terre, la pêche, le raisin, la pomme, l'avocat et la salade (Nicolas., *et al*, 1994).

III.4.1.2. Mécanisme réactionnel et substrats

En présence d'oxygène, la PPO catalyse l'hydroxylation de monophénols aux *o*-diphénole(l'activité crésolase) et l'oxydation des *o*-diphénols à leurs *o*-quinones correspondants (l'activité catécholase) (Figure 6). Ces enzymes sont capables d'insérer de l'oxygène dans une position ortho à un groupe hydroxyle existant dans un cycle aromatique, suivi de l'oxydation du diphénol à la quinone correspondante ; l'oxygène moléculaire est utilisé dans la réaction (Mayer., *et al*, 2006).

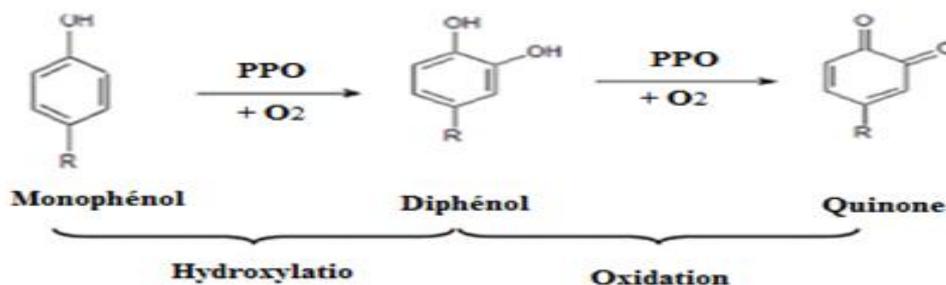


Figure 6 : Réactions catalysées par les polyphénolydases (Marusek., *et al*, 2006)

a) **Acides phénols** : Les acides phénoliques constituent l'une des principales classes de métabolites secondaires; ces composés contiennent un cycle benzène hydroxylé avec un ou plusieurs groupes carboxyle attachés directement ou indirectement à ce cycle. Ils sont représentés par les acides hydroxybenzoïques et les acides cinnamiques (Nicholson., *et al*, 2006) (Figure 7a et b)

L'acide chlorogénique (ester de l'acide caféique) apparaît largement dans les fruits, il est le substrat principal impliqué dans le brunissement enzymatique des tissus des fruits coupés ou endommagés suite à une exposition à l'air car il est le substrat ayant une plus grande affinité pour la PPO au côté de la catéchine (Barba.,*et al*, 2016).

b) **Flavonoïdes** : Les flavonoïdes sont comptés parmi les plus abondants groupes de produits naturels présents dans les plantes. Parmi les flavonoïdes, les substrats majeurs impliqués dans le brunissement enzymatique, flavonols, flavanols et anthocyanidines (Marshall., *et al*, 2006).

c) **Produits de la réaction du brunissement**

La réaction du brunissement enzymatique conduit à la formation des quinones de couleur jaune, très instables et qui réagissent soit avec des polymères de haut poids moléculaire ou forment un complexe macromoléculaire avec des acides aminés et des protéines. Ces composés intermédiaires donnent lieu à des pigments désignés par le terme général de mélanines. Leur teinte finale est brune ou noire, mais il existe des intermédiaires de couleurs diverses: rose, rouge, bleue-noire (Tomás-Barberán., *et al*, 2001)

La formation des quinones est à la fois dépendante de l'enzyme et de l'oxygène; une fois que cela a eu lieu, les réactions suivantes se produisent spontanément et ne dépendent plus de

la présence de la PPO ou de l'oxygène. (Joslyn., *et al*, 1951) ont résumé ces réactions chimiques qui peuvent expliquer la formation des mélanines brunes: La première réaction est considérée comme une hydroxylation secondaire de l'o-quinone ou d'un excès de l'o-diphénol, Les composés résultant (trihydroxybenzènes triphénoliques) réagissent avec les o-quinones pour former les hydroxyquinones.

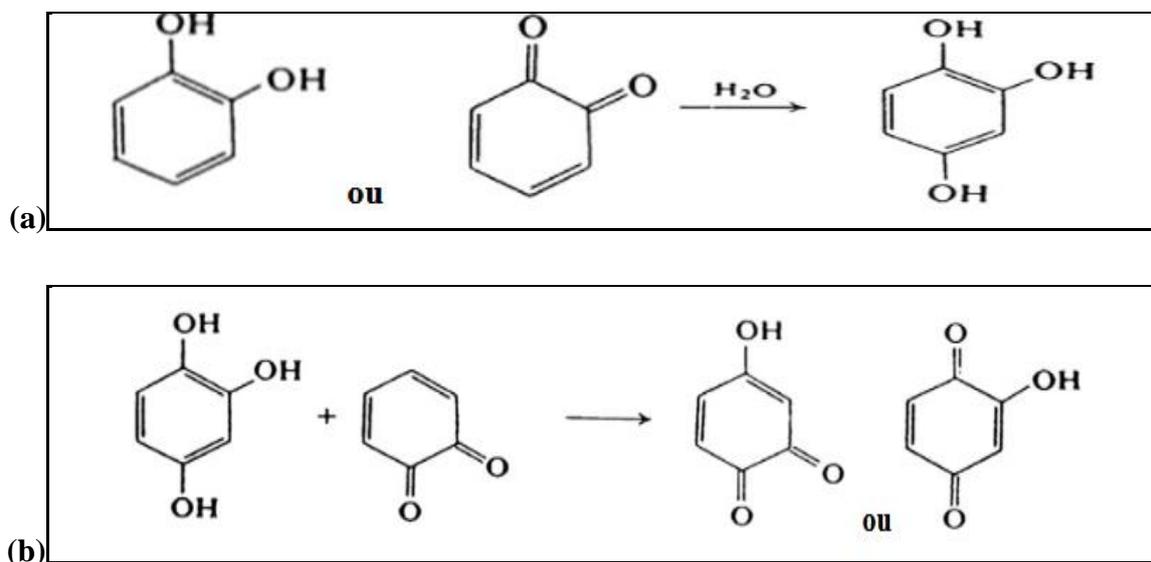


Figure 7 : Les étapes de formation des mélanines brunes: (a) hydroxylation secondaire de l'o-quinone ; (b) formation des hydroxyquinones

Les hydroxyquinones subissent une polymérisation et sont progressivement convertis en polymères rouges bruns, et enfin aux mélanines brunes qui apparaissent sur le site de la blessure du tissu végétal (Matheis., *et al*, 1984).

III.4.2. Peroxydases (POD)

Les peroxydases firent partie des premières enzymes étudiées après observation de l'apparition d'une coloration intense en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), de gâïacol et d'extraits animaux ou végétaux (Delannoy., *et al*, 2004). En effet, l'implication de la POD dans le brunissement est rapportée par de nombreux chercheurs.

III.4.2.1. Nomenclature

L'activité de la peroxydase a été identifiée chez les plantes (cytochrome c peroxydase, l'ascorbate peroxydase, ...), les micro-organismes et les animaux (myélo-peroxydase, la lacto-peroxydase, la thyroïdo-peroxydase, ...). (Welinder, 1992).

Les peroxydases des plantes sont-elles mêmes divisées en 3 classes : la classe I renferme les POD des procaryotes, la classe II renferme les POD fongiques sécrétées et enfin la classe III qui renferme les POD végétales sécrétées.

A. Peroxydase de classe I : Elle renferme les peroxydases d'origine procaryotique dont le cytochrome C- peroxydase (CcP) de *Saccharomyces cerevisiae*, les ascorbates peroxydases (AsP) et les catalase-peroxydases (CaP) bactériennes. Ces peroxydases se localisent dans la vacuole et les mitochondries (**Faguy., et al, 2000**).

B. Peroxydase de classe II : Elle contient les peroxydases sécrétées par les champignons. Leur structure ressemble beaucoup à celle des peroxydases de classe III. Ces enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine sont présentes chez un grand nombre de champignons notamment les basidiomycètes. Elles sont en général induites dans des conditions de carence nutritionnelle pour le champignon, même s'il existe de nombreuses exceptions. Parmi les peroxydases de la classe II on cite : les lignines-peroxydases (LiP) (EC 1.11.1.14), qui oxydent un grand nombre de composés aromatiques non phénoliques dérivés de la lignine; les peroxydases à manganèse MnP (EC 1.11.1.13), qui oxydent la lignine et les composés phénoliques qui en dérivent via l'oxydation du M^{n2+} en M^{n3+} qui sert d'intermédiaire d'oxydoréduction; et les versatiles peroxydases VP (EC 1.11.1.16) .

C. Peroxydase de classe III : Ces peroxydases sont sécrétées dans l'espace extracellulaire ou dans la vacuole. Elles sont en majorité végétale, telles que les peroxydases de navet, tabac, tomate, pomme, d'épinard...etc. (**Schuller., et al, 1996**).

Le nombre et la concentration des peroxydases des plantes varient en fonction du type tissulaire, de l'âge de la plante ainsi que les conditions de stress abiotique (**Martinez, 1997**).

Les peroxydases ont été détectées dans tous les organes de la plante et à différents stades de développement. Elles sont sécrétées dans la paroi ou dans le milieu environnant. Outre la paroi et l'apoplasme qui semblent être des lieux privilégiés de leur action (**Šukalović., et al, 2003**)

III.4.2.2. Mécanisme réactionnel et substrats

La peroxydase (EC 1.11.1.7) est un groupe d'enzymes qui catalyse des réactions d'oxydation en réduisant le peroxyde d'hydrogène à de l'eau tout en oxydant une variété de

substrats, ces derniers sont des donneurs d'hydrogène, comme les composés phénoliques, les nitrites, l'acide ascorbique et les amines en plus des précurseurs de lignine, de l'auxine ou certains d'autres métabolites secondaires. La réduction de l' H_2O_2 est réalisée en prenant des électrons à partir de ces diverses molécules donneuses (**Hiraga., et al, 2001**). C'est à cause de son rôle de catalyse de l'oxydation des composés phénoliques, en présence du peroxyde d'hydrogène et qui conduisant à la formation de produits de dégradation bruns. Les dommages mécaniques, la pourriture, la sénescence conduisent à la désorganisation cellulaire et initient la décomposition (**Mann., et al, 2008**).

III.5. Contrôle et prévention du brunissement enzymatique

La prévention du brunissement enzymatique a toujours été un défi aux scientifiques. Avec une meilleure connaissance du mécanisme des réactions du brunissement, il sera possible de proposer des processus qui évitent ou réduisent au minimum ce phénomène (**Nicolas., et al, 1994**).

De nombreux travaux ont été consacrés à la recherche d'inhibiteurs du brunissement enzymatique et plusieurs techniques et mécanismes ont été développés afin de maintenir la qualité, prolonger la durée de conservation de produit végétal et commander l'activité de ces enzymes. Ces mécanismes agissent sur un ou plusieurs facteurs de la réaction telle que :

- L'élimination de l'oxygène à la surface des fruits et légumes ;
- Inhibition des enzymes de la réaction ;
- Modification des substrats et/ou les produits du brunissement enzymatique ;
- L'abaissement de pH est très efficace pour l'inactivation des peroxydases végétales
- Utilisation des agents chélateurs de métaux.

III.5.1. Méthodes physiques

Elles ont pour objectif l'inactivation des enzymes de brunissement, parmi ces techniques on peut citer : le traitement hydrostatique par pression élevée, l'irradiation gamma, champ électrique pulsé et le traitement thermique (soit par blanchiment ou congélation) qui est la méthode la plus répandue pour stabiliser les fruits et légumes en raison de sa capacité pour détruire des micro-organismes et pour inactiver des enzymes.

Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et les plus appliquées pour contrôler du brunissement enzymatique, cependant, cette méthode ne peut être utilisée dans les procédés de transformation des fruits et légumes frais (Martinez., *et al*, 1995). Les températures appliquées lors du blanchiment varient considérablement en fonction du végétal à traiter et des enzymes à inhiber. En général, une exposition des enzymes du brunissement à des températures de l'ordre de 70-90 °C entraîne la destruction de leur activité catalytique, mais le temps requis à l'inactivation dépend du végétal. En contrepartie, cette technique peut être désavantageuse, car elle a comme conséquences des changements de saveur, texture, couleur et des pertes en vitamines et d'autres composants (Marshall., *et al*, 2006).

La congélation consiste à conserver des fruits et légumes à basse température (des températures inférieures à -18 °C). L'abaissement de la température a pour effet de ralentir l'activité métabolique des tissus végétaux du fait de la diminution de la quantité d'eau disponible à l'état liquide ce qui provoque une inactivation des enzymes. Cependant, à ces températures-là, il ya la formation des cristaux d'eau qui provoquent des dommages au niveau des structures cellulaires des organes des végétaux, ce qui met en contact les enzymes et leurs substrats, et le brunissement commence encore une fois quand la température en voisine 0 °C (Nicolas., *et al*, 1994).

III.7.2. Méthodes chimiques

Le traitement chimique est généralement le plus utilisé pour empêcher le brunissement enzymatique ; cependant, l'utilisation de ces composés chimiques dans les produits alimentaires est limitée aux composés qui sont non-toxiques et qui ne changeant ni le gout ni la saveur des produits alimentaires. Ces inhibiteurs chimiques peuvent affecter l'enzyme, les substrats ou les produits de la réaction. Les substances les plus utilisées sont les sulfites et l'acide ascorbique (McEvia., *et al*, 1992).

Les sulfites, en particulier sulfite de sodium, bisulfite de sodium et méta-bisulfite de sodium, constituent le moyen le plus efficace et le moins cher pour lutter contre le brunissement enzymatique (Eskin, 1990). Ils agissent comme des agents réducteurs en empêchant la formation des mélanines, car les sulfites se combinent avec les quinones pour former des suffoquions, comme ils peuvent induire l'inactivation des enzymes du brunissement en provoquant la réduction de leurs ponts disulfures. Cependant, bien que ces additifs soient efficaces, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a recommandé la

limitation de leurs utilisations, autant que possible dans le traitement des produits alimentaires, selon l’OMS la dose journalière autorisée de SO_2 est de 0,7 mg/kg du poids corporel (Rapeanu., et al, 2006).

L’Acide ascorbique (AA), est l’agent réducteur le plus connu alternatif aux sulfites. Il est généralement employé comme un agent anti-brunissement dans la fabrication des jus de fruits, fruits et légumes en boîte et des tranches de fruits coupés congelés. L’acide ascorbique (Vitamine C) empêche la formation des pigments bruns en réduisant les quinones en phénols initiaux (figure 8), il agit également comme un piègeur d’oxygène libre. Il est capable en outre de chélater le cuivre du site actif de la PPO. Cependant, le brunissement reprend juste après l’épuisement de l’acide ascorbique (Ashie., et al, 1996).

La vitamine C est en général employée avec d’autres inhibiteurs pour une meilleure prévention du brunissement, une combinaison d’acide ascorbique avec l’acide citrique est plus efficace que l’acide ascorbique seul (Eskin, 1990).

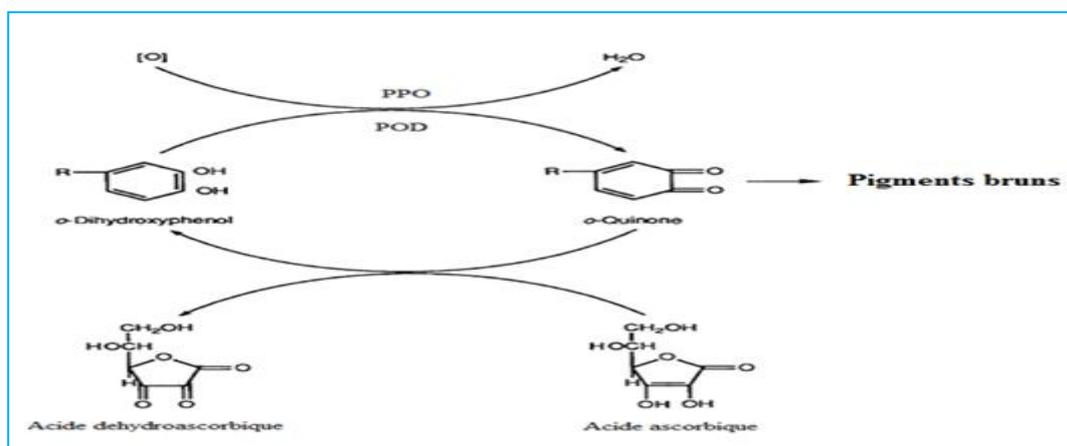


Figure 8 : Réduction des quinones par l’acide ascorbique (Walker, R., 1976).

Il existe d’autres substances chimiques qui peuvent se substituer aux sulfites. Parmi ces inhibiteurs chimiques se trouvent le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), le charbon actif, la bentonite, les cyclodextrines, les chitosans, les composés chélateurs de métaux qui réagissent, ou certains acides, organiques ou non tels que l’acide malique, tartrique, malonique, phosphorique ou chlorhydrique qui peuvent également être employés à différents niveaux de la réaction. Cependant, leur prix et leur effet sur la qualité gustative des aliments représentent leurs principaux inconvénients (López-Nicolás., et al, 2007).

Par ailleurs, malgré la multitude des traitements chimiques et physiques agissants contre le brunissement enzymatique et l'innocuité remise en question des sulfites, aucun substitut efficace, peu cher, pratique et sans effet néfaste sur les propriétés organoleptiques des produits alimentaires n'a pu servir d'alternative à ce produit, d'autre côté, la demande actuelle des consommateurs se tourne de plus en plus vers une alimentation naturelle dépourvue d'additifs synthétiques. Ce qui a poussé les chercheurs à découvrir de nouveaux inhibiteurs d'origine naturelle provenant de plantes médicinales les plus variées, tels que l'acide gallique, la barbarine, extraits de plantes médicinales, ou encore le miel qui est utilisé comme un inhibiteur non compétitif de la PPO, grâce à sa richesse en antioxydants (**Chen., et al, 2000**).

I.1. Matériel végétal

Notre travail a porté sur l'étude des propriétés antioxydants et anti-enzymes de brunissement des feuilles et des tiges de l'espèce *Marrubium vulgare L.* Les feuilles et tiges de cette espèce, ont été récolté à partir la région de Birgh balou de la wilaya de Bouira. La cueillette a été réalisée de manière aléatoire en Février 2018.

I.2. Extractions organique et aqueuse

I.2.1. Préparation de la poudre végétale

Une fois récoltées, les feuilles et les tiges de l'espèce de Marrube ont été nettoyées à l'eau courante et débarrassé de la poussière et d'autres impuretés, puis mises à sécher à l'ombre, à température ambiante et sous aération continue pendant 20 jours. Puis broyées à l'aide d'un moulin à café jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène et tamisée à l'aide d'un tamis manuel de 220 μ m de diamètre.

La poudre fine obtenue a été conservée dans des récipients en verre hermétiquement fermés, étiquetés et stockés à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à utilisation.

I.2.2. Préparation des extraits de feuilles et de tiges

La méthode d'extraction utilisée dans cette étude est la macération. Elle consiste en une extraction solide- liquide, la poudre végétale est mise en contact prolongé avec un solvant et sous agitation pour extraire les principes actifs.

➤ **Extraction méthanolique :** L'extraction est réalisée selon la méthode décrite par **Fallah, et al, 2008**). 25g de poudre de feuilles et de tiges ont été macérées dans 250 ml de méthanol à 80 %, (P/V: 1/10), sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation. La macération a été poursuivie sans agitation durant 24 heures à 4°C. Le macérât a été filtré sur papier Wattman N°3, et le filtrat obtenu a été évaporé à sec dans l'étuve à 40°C. L'extrait méthanolique récupéré a été conservé dans des flacons en verre hermétiquement fermés et à l'abri de la lumière.

➤ **Extraction aqueuse :** L'extraction aqueuse a été réalisée selon la méthode décrite par **Perez, (2010)**.

20g de poudre des feuilles et des tiges ont été portés à reflux pendant 3 heures à 60°C dans 200ml d'eau distillée. Le macérât ainsi obtenu a été filtré sur papier Wattman N°3 puis évaporé dans l'étuve à 40°C. L'extrait que l'on a récupéré a été conservé dans des flacons en verre hermétiquement fermés et à l'abri de la lumière.

I.2.3. Calcul du rendement

Les taux d'extraction ont été calculés par rapport à la matière sèche initiale selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = \left\{ \frac{\text{PES}}{\text{PPI}} \right\} \times 100$$

-PES : poids de l'extrait sec (g) ;

- PPI : poids de la poudre initial (g).

I.3. Dosages des composés phénoliques

I.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux des extraits aqueux et méthanolique été effectué par la méthode adaptée par **Singleton., et al, (1965)** modifié par **Ceo., et al, (2013)**.

C'est une méthode basée sur l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$) de couleur jaune. Le réactif est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), d'une coloration bleue foncée. La coloration produite, dont la longueur d'onde d'absorption maximum est comprise entre 725 et 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits (**Georgé., et al, 2005**).

Un volume de 1,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (0,1N) est ajouté à 200 µl de la solution d'extrait méthanolique ou aqueux préalablement dilués. Après 5 min d'incubation à l'obscurité, 1,5 ml d'une solution de carbonate de sodium à 6% est additionné au milieu réactionnel. L'absorbance est mesurée à 765 nm après 2 heures d'incubation à température ambiante par un spectrophotomètre du type «**Optizen 3220UV**». Le blanc a été préparé dans les mêmes conditions réactionnelles sans extrait.

La quantité des polyphénols totaux contenue dans l'extrait végétal est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec comme polyphénol de référence l'acide gallique. Les différentes expériences ont été réalisées trois fois de façon indépendante.

I.3.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes dans les extraits de marrube a été déterminée par la méthode colorimétrique décrite par **Arvouet-Grand., et al, (1994)**.

En présence du trichlorure d'aluminium (AlCl_3), les flavonoïdes sont susceptibles de former des complexes de couleur jaunâtre et cela grâce à leurs groupements (OH) libres en position C3 ou C5 et de l'oxygène en C4 (**figure 9**).

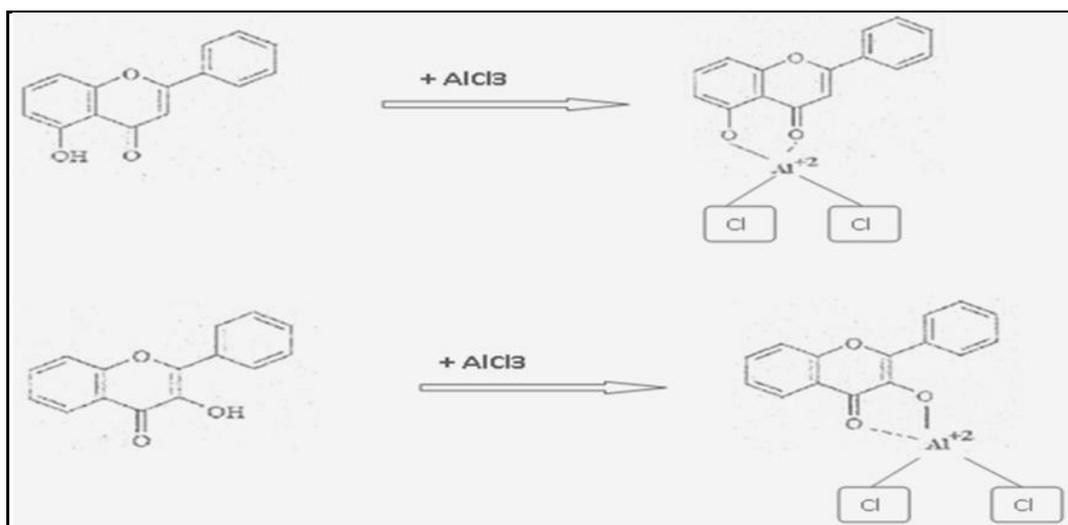


Figure 9: Réaction de chélation de trichlorure d'aluminium avec les flavonoïdes

1 ml du trichlorure de l'aluminium (AlCl_3) à 2% a été mélangé avec 1ml d'extraits. Des lectures d'absorption à 415 nm ont été prises après 10 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante contre un témoin préparé dans les mêmes conditions et sans extrait de marrube.

La concentration des flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS) en ce référant à une courbe d'étalonnage établi dans les mêmes conditions avec la quercétine comme flavonoïde standard. Les différentes expériences ont été réalisées trois fois de façon indépendante.

I.3.3. Dosage des flavonols

La teneur en flavonols dans les extraits de marrube a été déterminée selon la méthode décrite par **Kumaran., et al, (2007)**.

250µl d'extrait a été mélangé avec 250µl du trichlorure de l'aluminium ($AlCl_3$) à 2%, suivi par l'ajout de 1,5ml d'acétate de sodium à 5%. Des lectures d'absorption à 440 nm ont été prises après 2heures et 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante contre un témoin préparé dans les mêmes conditions sans extrait de marrube.

La concentration des flavonols est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS) en ce référent à une courbe d'étalonnage établi dans les mêmes conditions avec la quercétine comme flavonols standard .Les différentes expériences ont été réalisées trois fois de façon indépendante.

I.3.4. Dosage des tanins condensés

La teneur en tanins condensés dans nos extraits a été effectué selon la méthode décrite par **Chew., et al, (2011)**.

0,5 ml d'extrait brut a d'abord été mélangé avec 3 ml de vanilline à 4%, puis 1,5 ml de HCl sont ajoutés. Le mélange a été stocké à l'obscurité à température ambiante pendant 15 minutes. L'absorbance du mélange a été mesurée à 500 nm contre le blanc en utilisant un spectromètre de lumière UV. Chaque extrait a été analysé en triple et les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg CE / g MS).

I.4. Évaluation du pouvoir antioxydant

I.4.1. Test du DPPH

De point de vue méthodologique, le test du radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant les groupes SH, NH et OH (**Salah., et al, 1995**).

Cette technique consiste à mettre le radical libre DPPH (de couleur violette), en présence de l'antioxydant, ce qui provoque sa réduction et l'apparition d'une couleur jaune. Ce changement se traduit par une diminution de l'absorbance.

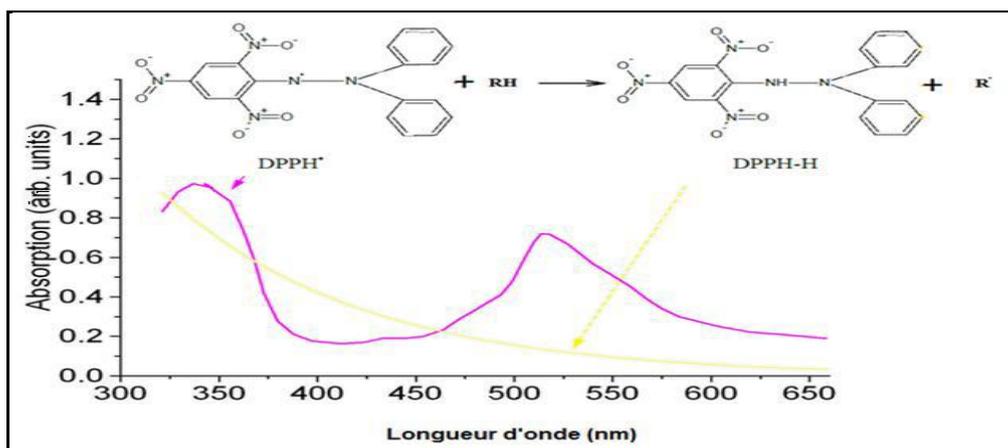


Figure 10: Structure et spectre d'absorbance UV/Vis du radical DPPH• et de sa forme réduite DPPH (Dransfield., *et al*, 2000).

Pour déterminer le rôle anti-radicalaire de nos extraits par le test DPPH nous avons utilisé la méthode décrite par Masuda., *et al*, (1999).

Un volume de 1 ml de la solution méthanolique du DPPH (0.1 Mm) est ajouté à 1ml d'extrait à des concentrations allant de 20 à 220µg/ml. Parallèlement, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 1 ml du méthanol ou d'eau distillée avec 1 ml de la solution de DPPH. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, une l'absorbance est faite à 517 nm. Le contrôle positif est représenté par une solution de deux antioxydants standards ; l'acide gallique et la quercétine dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions. Le test est répété trois fois de façon indépendante.

Le pouvoir antioxydant des extraits de plantes évalué par le test du DPPH est exprimé en pourcentage de réduction du radical DPPH• selon la formule suivante :

$$\% I = [A_0 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

Avec :

% I = pourcentage de piégeage du radical DPPH ;

A0 = DO du témoin (méthanol + DPPH) ;

A1 = DO de l'extrait + DPPH ;

A2 = DO du blanc (extrait + méthanol).

L'efficacité de piégeage du radical DPPH est évaluée en EC50, qui correspond à la concentration de l'extrait végétal présentant un taux de réduction du radical DPPH• de 50%.

I.4.2. Test du radical ABTS^{•+}

Le test ABTS ou Test TEAC (Trolox Équivalent Antioxydant Capacité) est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} (acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique). En milieu réactionnel le radical cationique ABTS^{•+} de couleur verte bleue intense, généré par l'oxydation de l'ABTS avec un sel fort tel que le persulfate de potassium qui réagit avec un donneur d'hydrogène (H[•]) pour donner une forme non radicalaire et non colorée (**figure 11**) (Lee., *et al*, 1995).

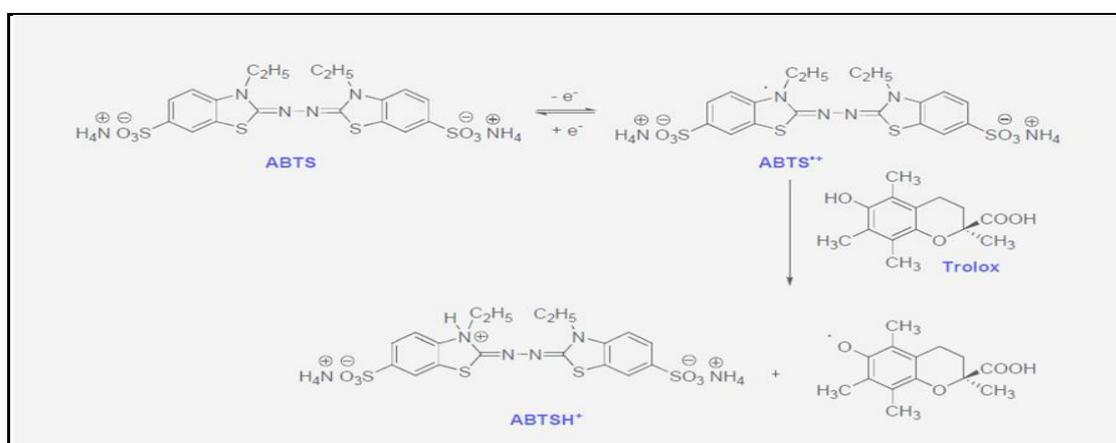


Figure 11: Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un donneur de H[•].

Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox (analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) à capturer le radical ABTS^{•+}.

L'activité antiradicalaire des extraits a été évaluée par le piégeage des radicaux ABTS^{•+} selon la méthode de Van den berg., *et al*, (1999).

Le radicale ABTS^{•+} est obtenue en mélangeant une solution de 7 mM d'ABTS avec une solution de 2,45 mM du persulfate de potassium (K₂O₈S₂). Le mélange est conservé à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 16 heures. Ensuite la solution d'ABTS^{•+} est diluée avec de l'eau distillée pour obtenir une absorbance de $0,700 \pm 0,02$ à 734 nm.

À 1,9 ml d'une solution ABTS^{•+}, 100 µl de solution d'extrait à différente concentration sont ajoutés. Après 7 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 734 nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un

antioxydant standard (le Trolox). L'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Pour chaque concentration le test a été réalisé en triplicatas.

Le pourcentage de l'activité scavenger du radical ABTS des extraits est calculé comme suit :

$$\% \text{ d'Inhibition} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Avec :

% d'inhibition : Pourcentage d'inhibition de radical ABTS^{•+} ;

A0 : Absorbance du contrôle (contenant seulement l'ABTS) ;

A1 : Absorbance de l'extrait + ABTS.

Le pouvoir antioxydant par le test ABT sera exprimé en termes de TEAC (Capacité Antioxydante Équivalente Trolox) qui correspond à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester à une concentration. Le résultat est donné en μM ou mM d'équivalent Trolox par g de matière sèche ($\mu\text{M ET/ g MS}$).

I.4.3. Test de réduction du fer (FRAP)

Le test de FRAP est basé sur la réaction de réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en un fer ferreux (Fe^{2+}) par un antioxydant (AH) (figure 12). Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleu vert intense apparaît très rapidement. (Amarowicz, 2004).

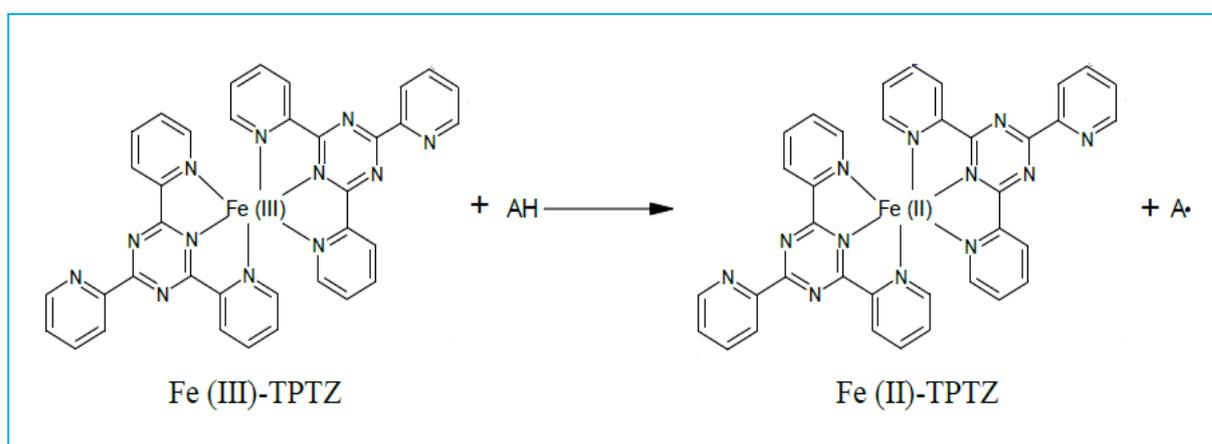


Figure 12 : Réduction du fer ferrique en fer ferreux par un antioxydant (AH).

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu, (1986)** rapportée par **Amarowicz., et al. (2004)**.

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations ont mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate à 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. Le mélange est incubé à 50°C au bain-marie pendant 20 min. 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% ont été ajoutés pour stopper la réaction. Une centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min a été réalisée. 2,5 ml de surnageant ont été mélangé à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 0,1%. L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; le butyl-hydroxyanisol (BHA).

I.4.4. Test de blanchiment au β -Carotène

Le test antioxydant utilisant le blanchiment β -carotène a été déterminé selon le protocole précédemment décrit par **Koleva., et al, (2002)**.

0,5 mg de β -carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme et mélangé avec 25 μl d'acide linoléique et 200 μl de tween 20. Le chloroforme a été évaporé sous vide à 40 °C, puis, 100 ml de l'eau distillée a été ajoutée. 2,5 ml de l'émulsion obtenue ont été transférés dans différents tubes contenant 500 μl de l'extrait. Les tubes ont été immédiatement incubés dans un bain marie à 50 °C pendant 120 min et l'absorbance a été mesurée à 470 nm avant et après le traitement de chaleur. Un témoin blanc a été effectué en parallèle. Le BHT a été utilisé comme contrôle positif et tous les tests ont été réalisés en triplicata.

I.5. Mesure de l'activité anti-enzymatique

Les activités anti-enzymatiques ont été évaluées par les enzymes utilisées dans le processus du brunissement enzymatique: la PPO et la POD. À cet effet, la source végétale de ces enzymes a été utilisées est le chou rouge.

- **Préparation des extraits enzymatique**

L'extraction des enzymes est réalisée selon le protocole décrit par **Ponce., et al, (2004)**. Le chou utilisés dans l'étude a été nettoyé puis broyé et homogénéisés à l'aide d'un mélangeur électrique à grande vitesse pendant 3 min avec 30 ml d'eau distillée à 4°C. Une filtration à

l'aide de deux couches de la gaze et une centrifugation à 1000 g pendant 15 minutes à 4°C ont été réalisées. Le surnageant obtenu a été utilisé comme extrait enzymatique.

I.5.1. Mesure de l'activité anti-peroxydase

L'inhibition de la peroxydase par les extraits de feuilles et tiges de marrube a été mesurée par méthode colorimétrique en utilisant le protocole décrit **Ponce., et al, (2004)**. L'activité anti peroxydase a été mesurée en présence et en absence des extraits en utilisant le gaïacol comme substrat et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) comme donneur d'hydrogène. L'oxydation enzymatique du gaïacol génère du tetragaiacol (**figure 13**), composé rouge rouille qui absorbe la lumière à environ 470 nm.

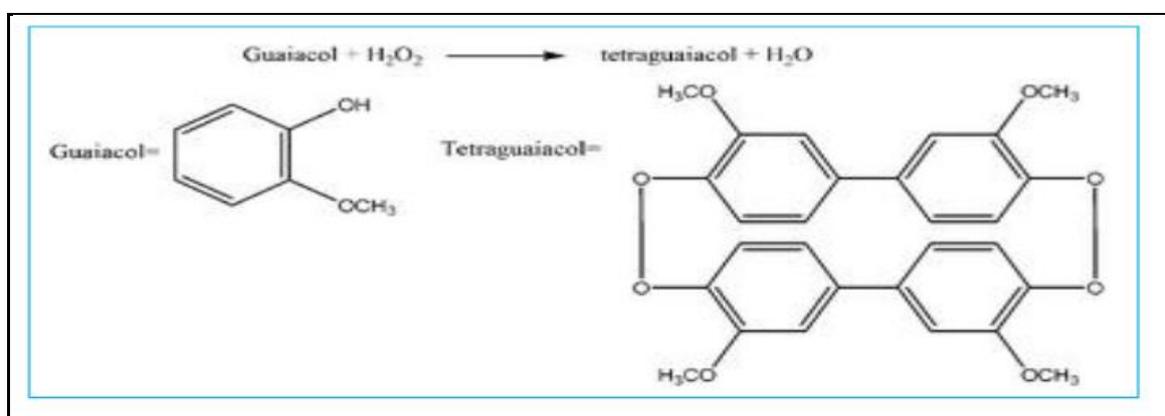


Figure 13: Oxydation du gaïacol en tetragaiacol (**Corban., et al, 2011**).

2,87 ml de la solution de substrat constituée de 10 ml de gaïacol à 1%, 10 ml de peroxyde d'hydrogène (0,3%) et 100 ml de tampon phosphate (0,05 M, pH= 6,5), 0,03 ml d'extrait et 0,1 ml d'extrait enzymatique ont été ajoutés. L'activité enzymatique a été suivie par mesure de la variation de l'absorbance à 470 nm pendant 5 min à température ambiante.

➤ Expression du taux d'inhibition (%)

Le taux d'inhibition de la peroxydase exprimé en pourcentage est calculé comme suit:

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{\text{Activité initiale}^* - \text{Activité résiduelle}^{**}}{\text{Activité initiale}^*} \times 100$$

* Activité enzymatique ($\Delta\text{DO} / \text{min}$) mesurée en absence d'extrait de marrube.

**Activité enzymatique ($\Delta\text{DO} / \text{min}$) mesurée en présence d'extrait de marrube.

I.5.2. Mesure de l'activité anti-polyphénoloxydase

Le protocole établi par Lee., *et al*, (2007). A permis la mesure de l'activité de la polyphénoloxydase par une méthode spectrophotométrique. Le substrat utilisé dans ce protocole est le pyrocatechol. L'oxydation du pyrocathécol se traduit par l'apparition de la couleur rouge-brun.

1 ml d'extrait de feuilles et tiges de marrube a été mélangé à 0,1 ml de l'extrait enzymatique et 0,9ml de tampon phosphate (50 mM, pH6, 8). La solution formée a été incubée pendant 5 minutes à 25°C. 1ml de pyrocatechol à 0,2 M a été ajouté. La variation de la DO a été suivie à 420 nm durant 1 minute. Le taux d'inhibition de la polyphénoloxydase a été calculé selon la relation suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{\text{Activité initiale} - \text{Activité résiduelle}}{\text{Activité initiale}} \times 100$$

*Activité enzymatique ($\Delta DO / \text{min}$) mesurée en absence d'extrait de marrube.

**Activité enzymatique ($\Delta DO / \text{min}$) mesurée en présence d'extrait de marrube.

I.6. Analyse statistique

Trois essais ont été réalisés pour chaque échantillon. Les résultats ont été présentés sous forme de moyen \pm écart type à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2007. L'analyse statistique a été effectuée par le test ANOVA/MANOVA en utilisant le logiciel STATISTICA 5.5.

II.1. Taux d'extraction

L'extraction des principes actifs des tiges et des feuilles de *Marrubium vulgare L* est réalisée par macération en utilisant le méthanol et l'eau distillée comme solvant d'extraction. Le taux d'extraction des deux parties de l'espèce marrube a été calculé par rapport à la masse de la poudre initiale.

Le tableau IV suivant résume le pourcentage des principes actifs que renferment les feuilles et les tiges de *M. vulgare L*.

Tableau IV : Taux d'extraction par macération des feuilles et tiges de *Marrubium vulgare L*.

Extrait \ Solvant	Eau %	Méthanol %
Feuille	12.96	20.45
Tiges	17.4	27.4

Le rendement de l'extraction observé dépend à la fois de la partie de la plante utilisée ainsi que le solvant d'extraction. On constate que quelle que soit la partie utilisée, le rendement obtenu avec le méthanol comme solvant d'extraction est supérieur à celui obtenu par extraction à l'eau. On peut dire que l'espèce de Marrube contient plus de métabolites solubles dans le méthanol que dans l'eau. Par ailleurs, le pourcentage d'extraction est plus élevé dans les tiges par rapport aux feuilles. Ces résultats peuvent être liés à la différence de répartition des métabolites secondaires dans les tiges et les feuilles, c'est-à-dire il y a d'autres métabolites que les polyphénols qui peuvent être présents dans les tiges mais absents dans les feuilles.

On constate que la tendance d'extraire plus de composés avec le méthanol qu'avec l'eau, cela peut être expliqué par le fait que le méthanol est un solvant fortement polaire connu pour extraire une large gamme de molécules dont une quantité importante (Bonnaillie, et al, 2012). Des études antérieures utilisant les mêmes conditions que celle de notre étude ont

montré que le méthanol représente le meilleur solvant d'extraction en le comparant avec d'autres solvants (Bouterfas., *et al*, 2014).

Bien qu'il soit difficile de mettre en place des comparaisons avec les données bibliographiques à cause de la multiplicité des paramètres qui influencent les taux d'extractions pour une même espèce végétale, la différence de rendement d'extraction peut être due à plusieurs paramètres. C'est le cas de la température, la méthode d'extraction utilisée, la granulométrie de la poudre, l'origine et le type du matériel végétal utilisé, le temps de macération, ainsi que les solvants employés et leurs degrés de pureté (Hayat., *et al*, 2009).

II.2. Dosages colorimétriques des extraits de marrube

II.2.1. Taux des polyphénols totaux

L'existence de plusieurs protocoles d'extraction des composés phénoliques permet de donner un résultat optimal pour chaque échantillon. L'extraction est souvent réalisée par utilisation d'eau, de méthanol, d'éthanol ou d'acétone comme solvant extracteur.

La teneur en composés phénoliques de nos échantillons est déterminée à partir d'une courbe standard utilisant l'acide gallique comme étalon de référence. Les taux seront exprimés en équivalents mg EAG/g MS.

Les taux en composés phénoliques dans les extraits de marrube obtenus (figure 14) montrent que les teneurs en polyphénols sont non négligeables. Ces taux varient de 23,48 mg EAG/g MS à 35,36 mg EAG/g MS dans l'extrait méthanolique et de 11,96 mg EAG/g MS à 12,57 mg EAG/g MS dans l'extrait aqueux.

Au vu des résultats obtenus, les teneurs en polyphénols des extraits méthanoliques sont largement supérieures à celles des extraits aqueux (figure 14). Les concentrations des composés phénoliques des extraits méthanoliques sont comprises entre $35,36 \pm 0,92$ mg EAG/g MS pour les feuilles et $23,48 \pm 0,66$ mg EAG/g MS pour les tiges.

Comme pour les extraits méthanoliques, l'extrait aqueux de feuilles est plus faible en composés phénoliques avec un taux de $13,46 \pm 0,37$ mg EAG/g MS suivie par les tiges avec $12,57 \pm 0,45$ mg EAG/g MS.

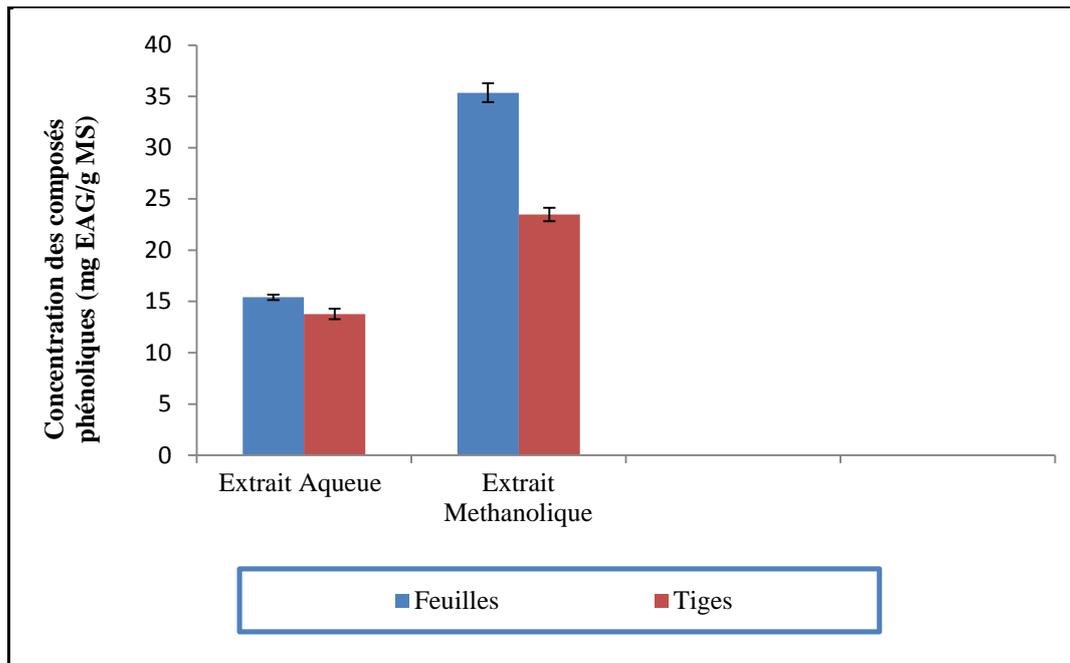


Figure 14 : Teneur en polyphénols totaux des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles et tiges de marrube. *Les résultats sont la moyenne de 3 essais. Les barres verticales représentent les écartsypes.*

Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec ceux rapportés par **Bouterfas., et al, (2014)** qui ont montré que la teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits méthanolique est plus élevée par rapport aux autres solvants tels que l'acétone, éthanol et l'eau.

Malgré la différence du mode d'extraction et la concentration de solvant méthanolique par rapport à ce qu'a été utilisé par **Bouterfas., et al, (2013)**, nous observant que le taux des polyphénols est supérieur dont l'extrait de feuille en comparaison à l'extrait de tige.

Les résultats de dosage des composés phénoliques totaux ne peuvent pas indiquer exactement les teneurs des extraits en ces composés, parce que malgré la sensibilité de la méthode de Folin Ciocalteu, ce réactif peut réagir encore avec les acides aminés aromatiques des protéines (surtout avec le tryptophane), les glucides réducteurs comme le glucose et le fructose et la vitamine C.

II.2.2. Taux des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont l'un des groupes les plus répandus des métabolites secondaires chez les plantes. Les résultats du dosage des flavonoïdes dans les extraits de marrube présentés dans la figure 15 montrent que leurs taux varient selon la partie étudiée ainsi que le

solvant d'extraction utilisé. La teneur en flavonoïdes dans les extraits méthanoliques est significativement plus importante que dans les extraits aqueux.

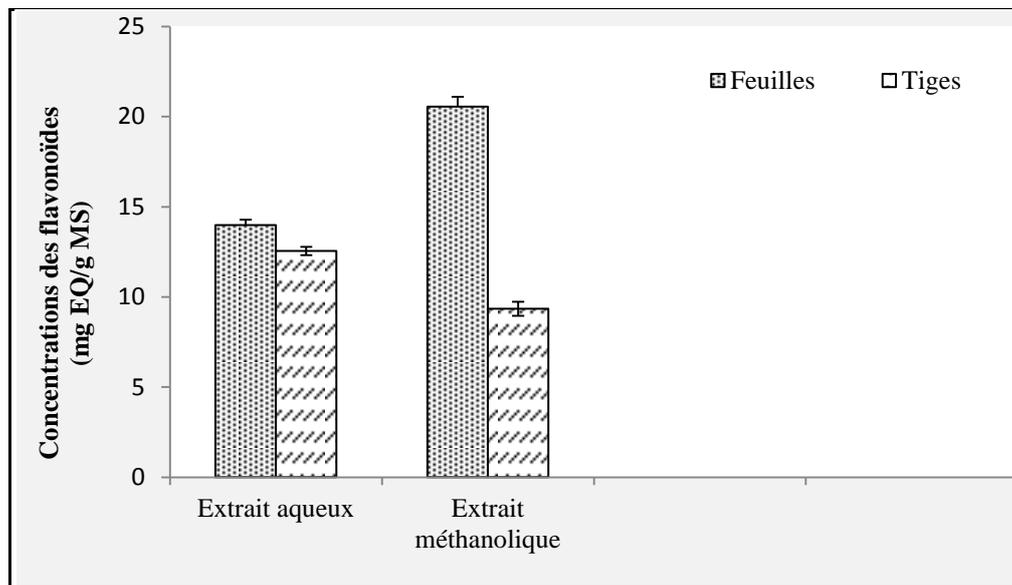


Figure 15 : Teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de marrube. Les résultats sont la moyenne de 3 essais. Les barres verticales représentent les écarts types.

L'extrait des feuilles présente les teneurs les plus élevées en flavonoïdes que ce soit pour les extrais méthanoliques ou aqueux avec respectivement 20.56 ± 0.54 et $13.99 \pm 0,289$ mg EQ/g MS. D'autre part, l'extrait des tiges présentes le taux le plus faible en flavonoïde avec $9.34 \pm 0,388$ mg EQ/g MS dans l'extrait méthanolique et de $12.55 \pm 0,233$ mg EQ/g MS dans l'extrait aqueux.

La teneur en composés phénoliques peut correspondre en premier lieu aux flavonoïdes, car selon certains auteurs, le Marrube contient des taux significatifs en flavones et en flavonols (Nicholson., *et al*, 2006).

Quelle que soit la partie étudiée, il semblerait que les flavonoïdes soient les polyphénols majoritaires. En effet, selon les résultats de dosages (figure 16), le rapport polyphénols totaux/flavonoïdes est supérieur à 0,5.

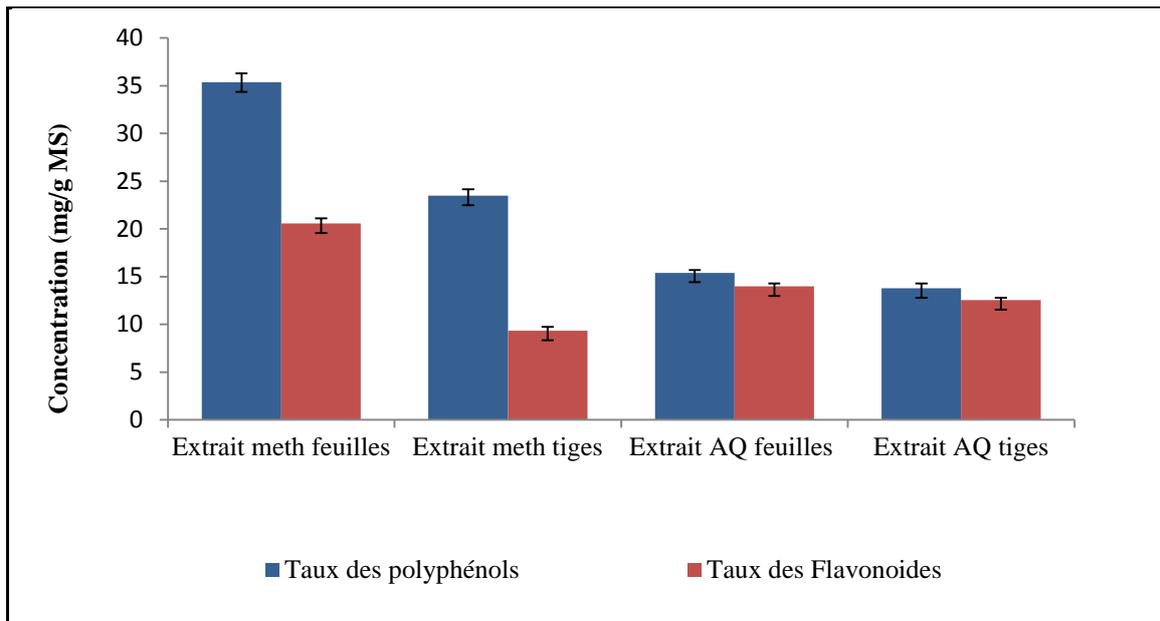


Figure 16 : Taux des polyphénols (mg EAG/g MS) et flavonoïdes (mg EQ/g MS) des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles et des tiges de marrube. *La teneur en polyphénols en mg EAG/mg MS et les flavonoïdes en mg EQ/mg MS. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3). Les barres verticales représentent les écarts types.*

Les proportions de flavonoïdes dans les polyphénols totaux obtenus sont plus au moins en accord avec ceux rapportés par des études antérieures comme celle de **Stankovic, (2011)**, qui ont déduit que les flavonoïdes représentent la majorité des phénols totaux dans les extraits méthanoliques.

II.2.3. Taux des flavonols

Les flavonols sont une des classes des flavonoïdes tels que le Kaempférol, Quercétine et Myrecétine. Les résultats du dosage dans les extraits de marrube présentés dans la figure 17 montrent que le taux des flavonols varie selon la partie et le solvant d'extraction utilisé. Cette teneur est significativement plus importante dans les extraits méthanoliques que dans les extraits aqueux.

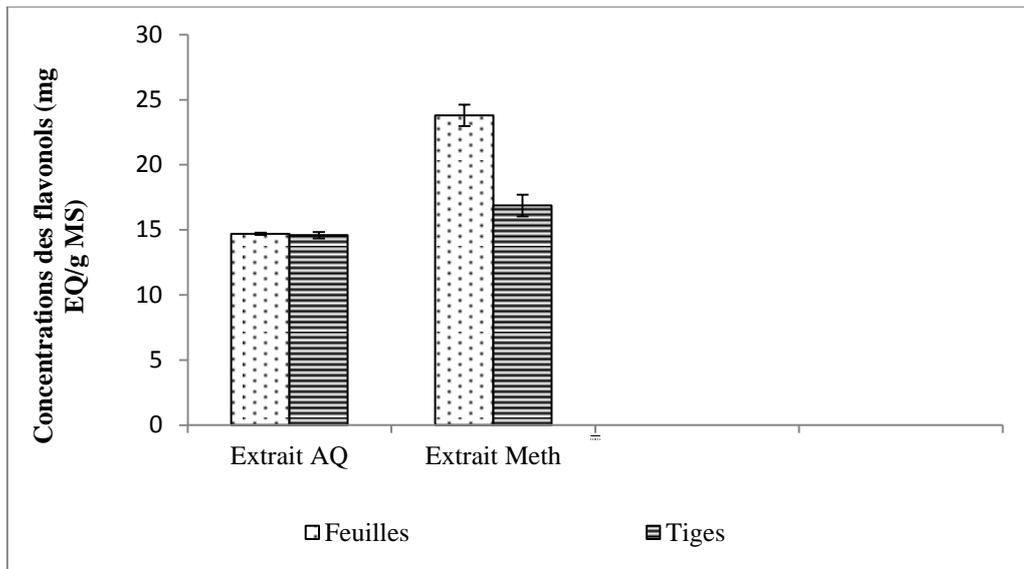


Figure 17 : Teneur en flavonols des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de marrube.

Les résultats sont la moyenne de 3 essais. Les barres verticales représentent les écartypes

L'extrait des feuilles présente les teneurs élevées que ce soit pour les extrais méthanoliques ou aqueux avec respectivement 23.8 ± 0.81 et $16.88 \pm 0,83$ mg EQ/g MS. D'autre part, l'extrait des tiges présente des taux faible en flavonols avec $14.7 \pm 0,09$ mg EQ/g MS dans l'extrait méthanolique et de $14.59 \pm 0,250$ mg EQ/g MS dans l'extrait aqueux.

II.2.4.Taux des tanins condensés

Les concentrations des tannins condensés sont reportées dans la figure 18.

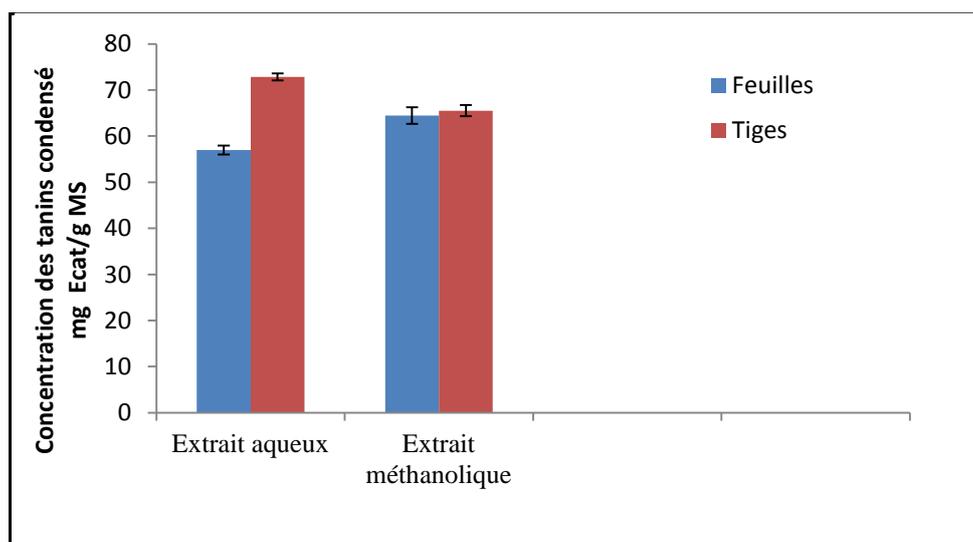


Figure 18 : Teneur en tanins condensée des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de marrube. *Les résultats sont la moyenne de 3 essais. Les barres verticales représentent les écartypes*

D'après la figure 18, la teneur la plus élevée en tanins présente dans les tiges avec une concentration $72,82 \pm 0,772$ mg EC/g MS pour l'extrait aqueux et $65,52 \pm 1,216$ mg EC/g MS pour l'extrait méthanolique, par contre les feuilles présente la teneur la plus faible pour l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique. ($56,99 \pm 0,992$ mg EC/g MS et $64,46 \pm 1,815$ mg EC/g MS respectivement).

Ce résultat est en accord avec de nombreux résultats des chercheurs qui ont indiqués que l'extrait aqueux enregistre des teneurs les plus élevées en tanins condensés dans les tiges (**Ghedadba., et al, 2014**). Par contre, le méthanol extrait faiblement les tanins quelle que soit la méthode d'extraction. Cependant, à haute température, l'eau et l'acétone extraient aussi d'autres substances telles que les protéines, les lipides et les colorants non phénoliques qui causent des interférences lors de dosage des tanins.

Nous pouvons alors conclure que l'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires. Les teneurs en tanins condensés peuvent être variables également en raison de plusieurs facteurs tels que : la sensibilité des tanins aux voies de dégradation (l'oxydation, la lumière...), le stade de maturité des fruits, les conditions climatiques ou le stress de prédation (**Mahmoudi., et al ; Khali., et al, 2013**).

II-3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits de marrube a été évaluée par plusieurs quatre tests in vitro à savoir: ABTS, le DPPH, le Blanchissement de la bêta-carotène et le pouvoir réducteur.

II.3.1. Activité scavenging du radical DPPH

Le test de DPPH est un des tests les plus utilisés pour déterminer l'activité anti-radicalaire des extraits de plante. De nombreuses études démontrent l'importance portée aux antioxydants naturels dans les domaines de l'industrie agroalimentaire et médicale, mais également leurs rôles protecteurs contre les espèces réactives oxygénées, ainsi que la corrélation existant entre les composés bioactives des matières végétales et leur capacité antioxydants (**López-Nicolás., et al, 2007**).

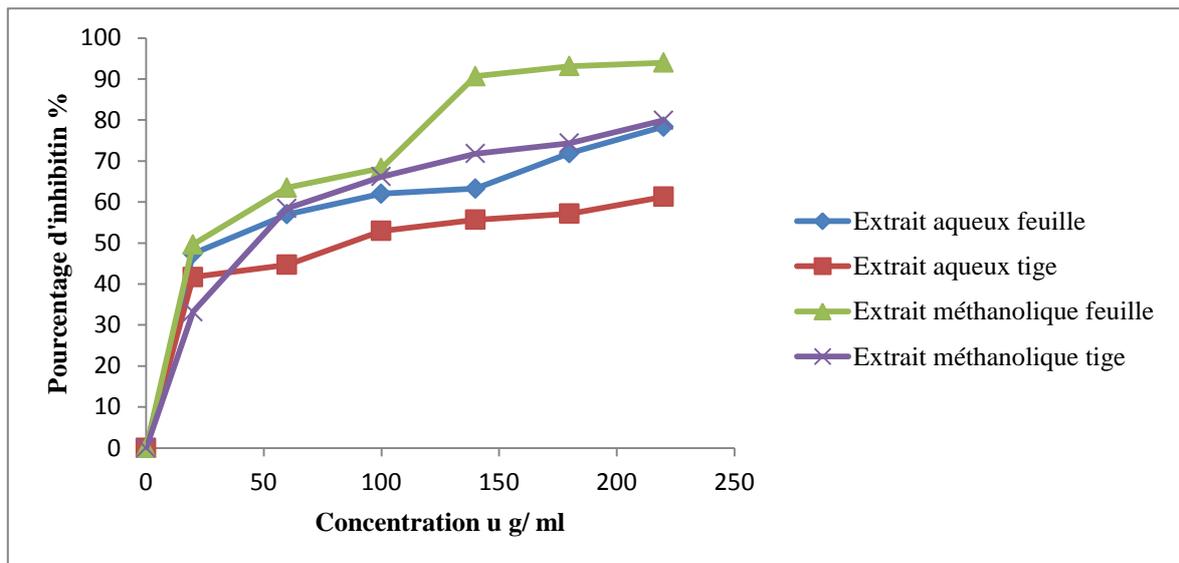


Figure 19 : Activité antiradicalaire DPPH des extraits de *Marrubium vulgare* (chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

Nos résultats montrent que les extraits de *M. vulgare* ainsi que les standards exercent une activité anti radicalaire d'une manière dépendante de la concentration (Figures 19). L'activité augmente avec la concentration pour atteindre un maximum au-delà duquel elle reste constante. Ce phénomène est interprété par le transfert de(s) électron(s) célibataire(s) qui sont localisés dans l'orbitale externe de l'atome de nitrogène (N) du DPPH à cause de leur réaction avec les électrons issus des molécules antioxydante (l'antioxydant va être oxydé par donation des protons pour réduire le DPPH[•] en DPPH-H) et après avoir atteint une concentration donnée l'antioxydant stoppe de ce réagir avec le radical DPPH-H complètement réduit quoique la concentration de l'extrait à augmentée puisque cela s'accompagne par la saturation des couches électroniques externes du radical.

Les résultats obtenus montrent que les extraits méthanoliques à différentes concentrations présentent un pouvoir piègeur du radical DPPH avec des pourcentages allant de 93.97 % dans le cas d'utilisation des extraits de feuille et de 79.94 % pour les extraits de tige, alors qu'il est de 78.38 % pour l'extrait aqueux et de 61.27 % pour les extraits des tiges. Cette activité scavenging des extraits reste toutefois largement inférieure à celle obtenue avec l'acide gallique (acide phénolique) ou la quercétine (flavonoïde). Ces deux polyphénols purs, utilisés comme référence, présentent un pouvoir piègeur du DPPH de 90 % pour une concentration de 0,01 mg/ml.

Pour une même espèce végétale, la variabilité des résultats de l'activité anti radicalaire du DPPH rapportés peut s'expliquer par la nature de la partie utilisée de la plante, son degré de maturation, mais aussi par le procédé d'extraction appliqué (Xu., *et al*, 2008).

La méthode DPPH a été choisie, en raison de sa simplicité, rapidité, sensibilité et de sa reproductibilité, mais aussi parce que les mesures IC₅₀ exprimées en µg/ml sont comparables entre elles et non pas seulement à celle d'une référence. Les pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations pour chaque extrait de la plante et les résultats sont présentés dans la **figure 20**.

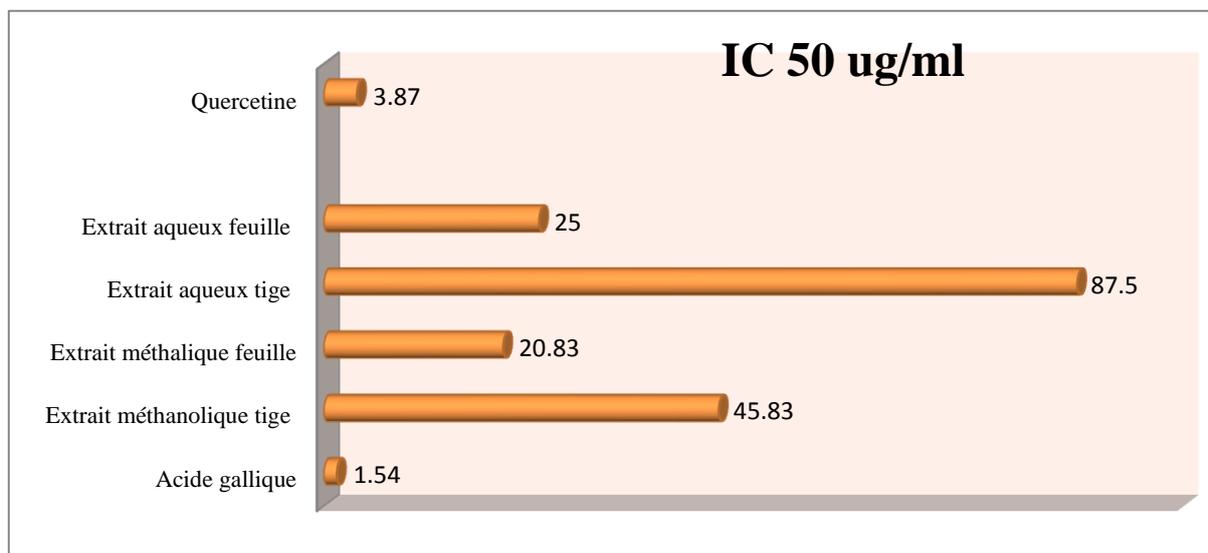


Figure 20: Concentrations d'inhibition à 50% du radical DPPH•. *Les résultats sont la moyenne de 3essais.*

La concentration inhibitrice à 50 % a été définie par Chock, (2000), comme la concentration qui permet la diminution de 50 % de l'activité antioxydante initiale, il est inversement lié à la capacité antioxydant.

L'extrait méthanolique des feuilles de notre plante présente l'activité antiradicalaire la plus élevée (IC₅₀= 20.83µg/ml). Par contre, l'activité antiradicalaire la plus faible a été enregistrée par l'extrait aqueux des tiges (IC₅₀= 87.5 µ g/ml).

Selon les travaux sur la même l'espèce, cette activité est probablement due aux phénylpropanoïdes glycosides, qui sont considérés par plusieurs chercheurs comme des puissants antioxydants. Les plus importants sont le forsythoside B, le ballotétroside, l'arénarioside, et l'actéoside (Martin-Nizard., *et al*, 2003).

Nos résultats sont en d'accords avec ceux des extraits méthanolique de *M.vulgare* de Pologne est qui exprime une activité antioxydante remarquable vis-à-vis du radical DPPH (IC50= 1,15 μ g/ml). De même, on remarque que l'extrait des feuilles exerce une forte activité inhibitrice avec IC50 de 20.83 μ g/ml chez l'extrait méthanolique et de 25 ug/ml pour l'extrait aqueux. Cette activité anti radicalaire considérable de *M. vulgare* est peut-être associée à l'effet synergique entre les composés phénoliques et les flavonoïdes (Ghedadba, 2018).

II.3.2. Activité scavenging du radicale ABTS

Afin de valider les résultats de l'efficacité antioxydants de nos extraits obtenus précédemment par test anti radicalaire du DPPH, nous avons utilisé un 2^{ème} test basé sur la capacité de piégeage du proton du radical cationique ABTS (Van den berg, R., et al, 1999).

Les résultats (tableau V) indiquent que pour une concentration de 1mg/ml, le pourcentage d'inhibition du radical ABTS par les extraits méthanoliques de marrube étudiées est de 65,10 % pour les tiges et de 68,24 % celle de l'extrait méthanolique feuille. Par contre dans le cas des extraits aqueux 52.26 % pour l'extrait de tige et de 58.11 % celle de l'extrait de feuille. Les concentrations IC50 du radical ABTS des différents extraits de étudiés sont comprises entre 67.14 et 95.714 μ g/ml. Les extraits des feuilles méthanolique et aqueux enregistrent les activités anti-radical ABTS les plus élevées avec des (IC50= 67.14 u g/ml) et de (76.190 μ g/ml) respectivement, tandis que l'extrait des tiges de faible activité avec des (IC50= 87.142 μ g/ml) d'extrait méthanolique et de (IC50= 95.714) d'extrait aqueux.

Tableau V : IC 50 du radical ABTS par les extraits du marrube.

Extrait	Pourcentage d'inhibition par 100ug/ml d'extrait	IC50 (μ g/ml)
Extrait méthanolique feuille	68.24	67.14
Extrait aqueux feuille	58.11	76.190
Extrait méthanolique tige	65.10	95.714
Extrait aqueux tige	52.26	87.142

Des travaux montrant l'implication des composés phénoliques notamment les flavonoïdes dans l'activité scavenger du radical ont été rapportés, montrent l'existence d'une corrélation positive entre les activités scavenging du radical cationique ABTS et la teneur en composé phénolique ($r= 0,946$) dont 72% de l'activité scavenging est réalisé par les flavonoïdes (Floege., *et al*, 2011).

L'activité antioxydant peut être attribuée ou influencée par des composés non phénoliques tels que les lipides, les sucres et la chlorophylle. L'étude menée par Heim.,*et al*, (2002) à montre que les groupements hydroxyles des composés phénoliques et flavonoïdes jouent un rôle très important dans le pouvoir antioxydant Par contre Zheng., *et al*, (2001) ont rapporté que l'activité antioxydante des composés phénoliques est essentiellement due au nombre de groupements hydroxyles et leurs positions sur le cycle aromatique.

II.3.3. Pouvoir réducteur

En plus des méthodes précédemment décrites, l'activité antioxydante a été évaluée par le test FRAP basé sur la capacité des extraits à réduire les ions fer ferrique (Fe^{3+}) en ions de fer ferreux. La réduction du fer ferrique s'accompagne d'un changement de couleur du jaune vers le bleu vert. L'intensité de la couleur dépend du potentiel réducteur des composés présents dans le milieu réactionnel (Zou., *et al*, 2004).

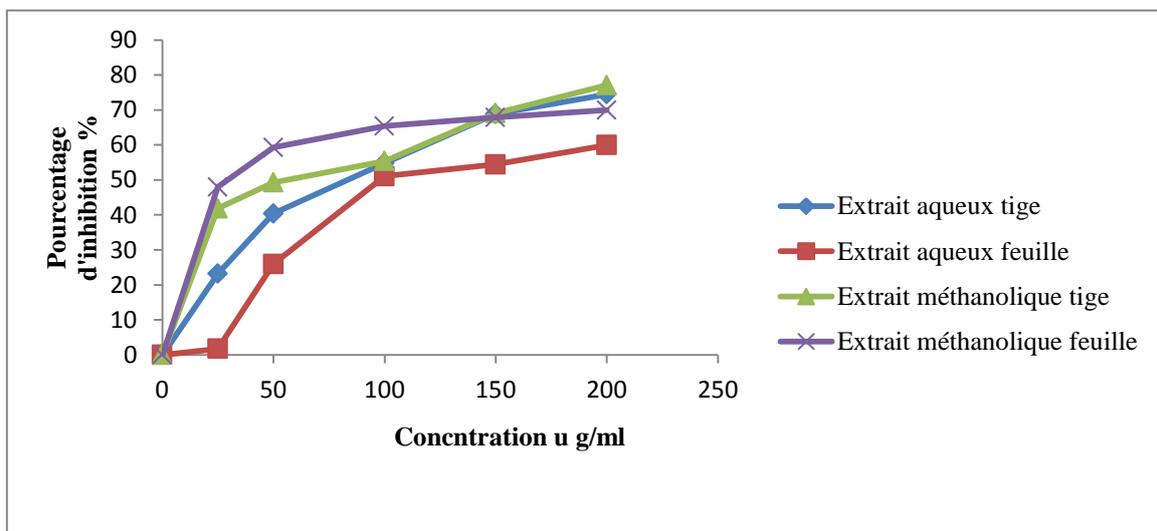


Figure 21 : Pouvoir réducteur des extraits méthanolique et aqueux de marrube.

Les résultats présentés ci-dessus montrent que les extraits de *M. vulgare* réduisent les ions ferriques en ions ferreux d'une manière dépendante de la concentration. On note que les

extraits méthanolique de la plante *M. vulgare* montrent une excellente capacité réductrice avec des pourcentages d'inhibition de 77.05 % pour les extraits tige et de 69.94 % pour celle des extrais des feuilles. Les extraits aqueux de *M. vulgare* témoignent également une réduction considérable avec des pourcentages d'inhibition de 74.45 % et 59.94 % pour les extraits de tige et de feuilles respectivement.

Pour une même concentration d'extraits aqueux et méthanoliques (1mg/ml), l'activité FRAP des extraits évaluée par la variation d'absorbance à 700 est nettement inférieure à celle du standard (79.11 % pour une concentration) (**figure 22**).

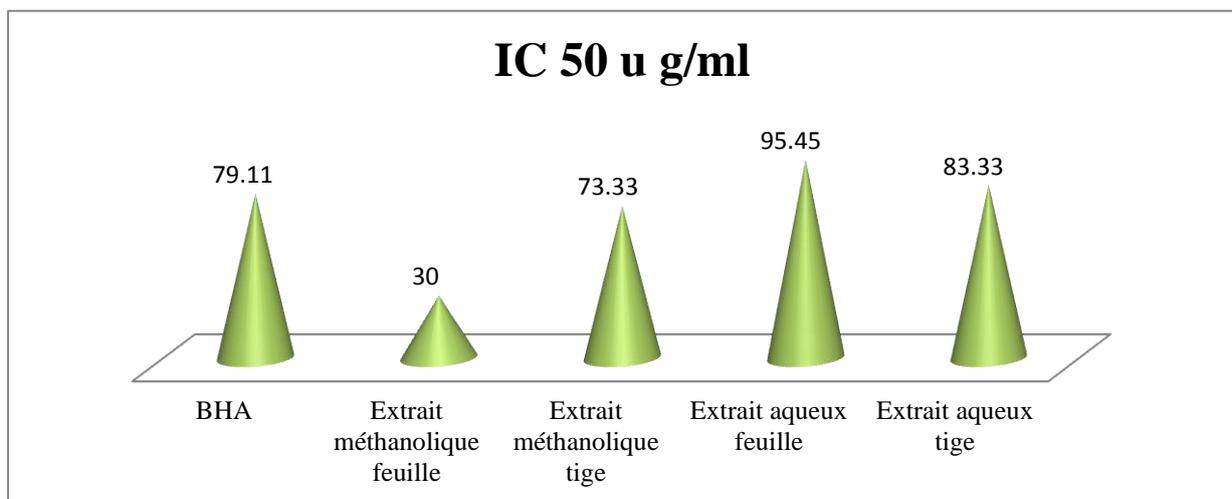


Figure 22 : IC₅₀ du pouvoir réducteur des extraits méthanolique est aqueux des feuilles et de tiges de marrube. Les résultats sont la moyenne de 3essais.

Les résultats de pouvoir réducteur ont indiqué que l'activité la plus élevée a été enregistré par les extraits méthanolique des feuilles qui présente une valeur d'inhibition de 50 pourcent de l'ordre de 30 µg /ml, suivi par l'extrait tige de (IC₅₀ = 73.33 ug /ml) par contre les extrait aqueux ont présenté des activités inférieures pour les feuilles et les tiges (IC₅₀ = 95.45 µg/ml et 83.33 µg/ml respectivement).

Nos résultats sont en accord avec des études antérieures celles obtenues par **Ghedadba, (2018)** qui indiquent que les extraits méthanoliques de marrube sont dotés d'un pouvoir réducteur plus élevé que les extraits aqueux. Nos résultats confirment également que ce processus d'oxydation dépend de multiples paramètres tels que la concentration de l'ion métallique, des polyphénols, la température, le pH, la présence d'agents complexant...

Une autre étude **Van., et al, (1996)**, analysant la capacité de réduction du fer par les polyphénols des plantes montre que le noyau catéchol est la structure qui est associée positivement dans le pouvoir réducteur et selon cette étude cette structure augmente le pouvoir réducteur d'un composé à 36 % par rapport à un autre qui n'en contient pas. Ont montré que cette activité est due à la participation des groupements OH liés au noyau catéchol.

II.3.4. Test de blanchissement du β -carotène

Les activités inhibitrices de peroxydation des lipides par nos extraits ont été évaluées par l'essai du blanchiment du β -carotène qui est fondé sur la perte de la couleur jaune de β -carotène due à sa réaction avec radicaux libres qui sont les résultats d'oxydation de l'acide linoléique dans une émulsion. Le β -carotène est employé comme agent de coloration en boissons, et sa décoloration réduirait nettement la qualité de ces produits. De ce fait, il est employé dans l'évaluation de l'activité antioxydant des extraits de *Marrubium vulgare* (**Ghedadba., et al, 2014**).

La cinétique de blanchiment du β -carotène en présence ou l'absence des extraits et de l'antioxydant standard (BHA) est représentée dans la **figure 23**.

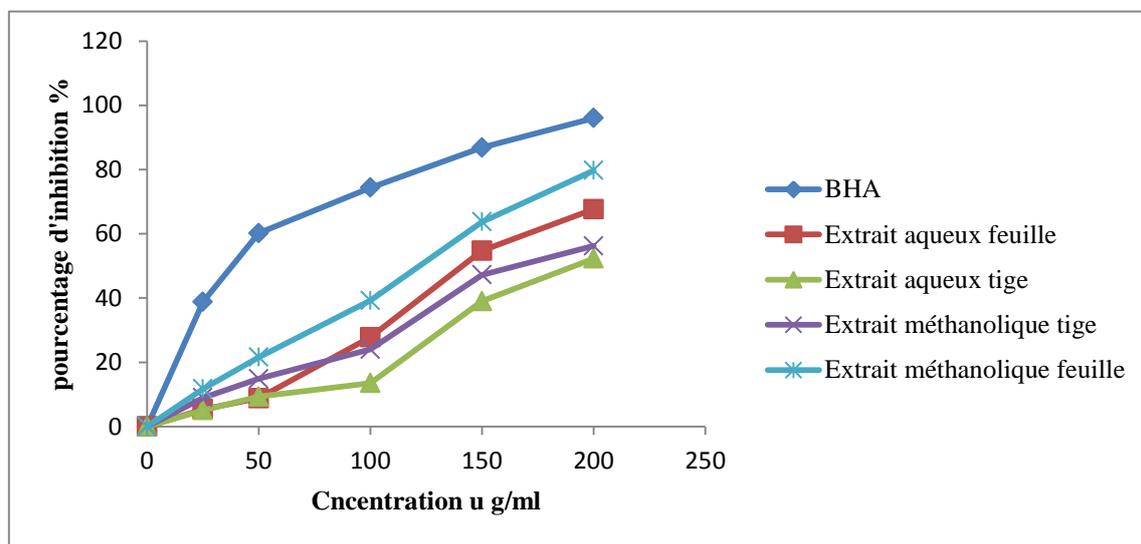


Figure 23 : Cinétique de blanchiment du β -carotène en présence des extraits de *M. vulgare* et du standard (BHA).

La Figure 24, montre que l'inhibition la plus élevée a été enregistrée par l'extrait méthanolique des feuilles ($79,74 \pm 3.51\%$), suivi par celle de l'extrait aqueux de la même

partie de la plante ($67,65 \pm 3,83\%$). Les résultats montrent aussi que l'extrait feuille inhibe l'oxydation du β -carotène d'une manière significative par rapport aux extraits tiges qui enregistre un pourcentage d'inhibition de $56,21 \pm 1,02$ pour l'extrait méthanolique et de $52,29 \pm 1,23$ pour l'extrait aqueux.

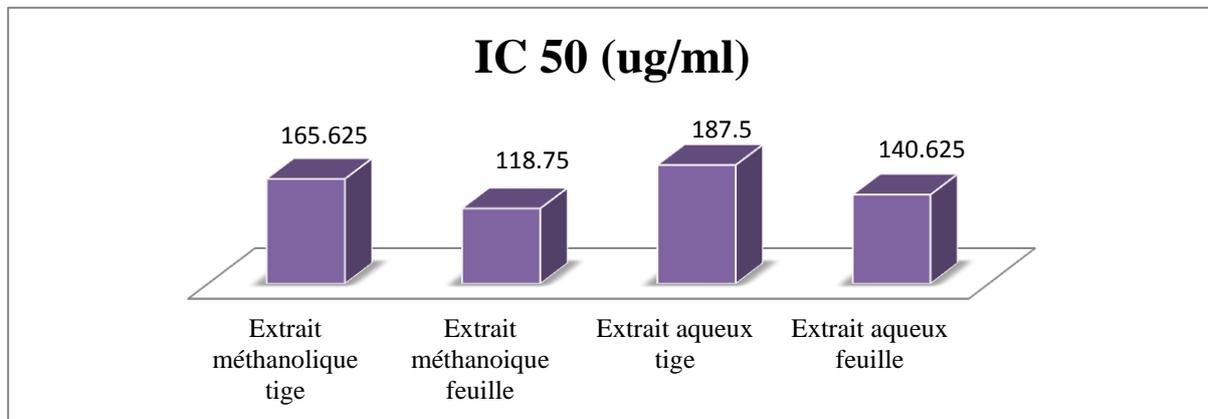


Figure 24 : IC₅₀ du radical β -carotène des extraits méthanolique et aqueux des extraits de marrube.

Les valeurs des concentrations inhibitrice à 50% (Figure 24) indiquent que l'activité la plus élevée a été montrée par l'extrait de méthanol feuille du *Marrubium vulgare* qui enregistre une valeur d'inhibition d'ordre de $118,75 \mu\text{g/ml}$, suivi par l'extrait aqueux feuille ($\text{IC}_{50} = 140,625 \mu\text{g/ml}$) par contre les extraits des tiges du *Marrubium vulgare* ont présenté des activités inférieures ($165,25 \mu\text{g/ml}$) et de ($187,5 \mu\text{g/ml}$) méthanolique et aqueux respectivement.

Nos résultats sont en accord avec ceux de (bukalkas, 2005) qui ont indiqué que le coefficient le plus élevé de l'activité antioxydante du *Marrubium vulgare* dans le système de blanchiment du β -carotène est apporté par l'extrait méthanol du marrube.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de plusieurs groupes de recherche, qui ont rapporté une corrélation positive entre la teneur en phénolique et l'activité antioxydante qui dépend de plusieurs facteurs, comme : 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 (Ghedadba., et al, 2014).

Notons que le test de blanchiment de β -carotène est plutôt influencé par la nature et la structure des molécules présentes dans l'extrait. C'est dans ce contexte que Mahmoudi., et al,

(2013) ont montré que les fractions issues de l'acétate éthyle de *Tamariaxa phylla* montrent un excellent pouvoir antioxydant (96,52 %) par rapport à la fraction butanolique de la même plante qui présente une faible activité antioxydant (10,10 %), malgré que le butanol soit plus polaire que l'acétate d'éthyle.

La comparaison entre la capacité des quatre extraits de la plante dans l'inhibition de l'oxydation du β -carotène indique que les extraits des feuilles de *M. vulgare* sont les plus actifs, cela est due à leurs richesses en composés phénoliques comme nous l'avons montré lors du dosage de ces constituants.

II.4. Relation entre les différentes activités antioxydantes

La détermination de l'activité antioxydante nécessite de nombreux tests. Toutefois, il est nécessaire de réduire le temps d'expérimentation, afin de pouvoir mettre en place une méthode de sélection non biaisée, nous avons choisi de comparer les coefficients de corrélation précédemment identifiés dans notre étude. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau VI.

Tableau VI : Coefficients de corrélation entre polyphénols, flavonoïdes, DPPH, ABTS, pouvoir réducteur, et β -carotène des extraits méthanoliques et aqueux de *Marrubium vulgare*.

Variable	Polyphénols	Flavonoïdes	DPPH	ABTS	B-carotène	Pouvoir réducteur
Polyphénols	1					
Flavonoïdes	0.664	1				
DPPH	0.597	0.517	1			
ABTS	0.492	0.952	0.616	1		
B-carotène	0.725	0.788	0.933	0.831	1	
Pouvoir réducteur	0.957	0.737	0.393	0.525	0.609	1

Ces résultats montrent qu'il existe une bonne corrélation entre la présence de flavonoïdes, le pouvoir réducteur, B-carotène et l'activité d'ABTS avec des coefficients de corrélations allant de 0,737, 0,788 et 0,952 respectivement.

Ces résultats nous ont permis de conclure que l'activité antioxydante des composés phénoliques est réalisée en grande partie par les flavonoïdes.

Une forte corrélation entre le test de B-carotène et DPPH ainsi que le test ABTS (0,933 et 0,831 ; respectivement) a été remarquée.

D'après cette corrélation est due à l'existence des molécules bioactives dotées des propriétés réductrices et anti-radicalaires fortes. Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs montrant l'existence d'une bonne corrélation entre les polyphénols totaux et les activités antioxydantes des extraits de plantes notamment les extraits d'espèces de marrube (Sing., *et al*, 2004).

III.5. Activité anti-enzymatique

III.5.1. L'activité anti-peroxydase:

Le contrôle et la prévention du brunissement enzymatique peuvent être réalisés de trois façons. La première repose sur l'inhibition des enzymes qui causent le brunissement, la deuxième repose sur le piégeage des quinones et la dernière repose sur la limitation de la disponibilité de l'oxygène

Dans notre travail nous nous sommes intéressés à l'étude de l'efficacité des extraits (méthanolique et aqueux) de marrube à inhiber l'activité de la peroxydase extrait enzymatique de choux rouge responsable du brunissement des fruits et végétaux.

Le taux d'inhibition de l'activité anti-peroxydase est déterminé par une méthode colorimétrique, qui permet d'estimer le taux de gaiacoquinone (produit coloré) suite à la dégradation du gaiacol (substrat incolore) en présence d'H₂O₂ comme co-substrat.

Nos extraits de *M. vulgare L* et l'antioxydant de référence (acide ascorbique) utilisés, à la concentration de 500ug/ml, présentent des activités inhibitrices à des degrés variables. Les résultats sont reportés sur la **figure 25** et **figure 26**.

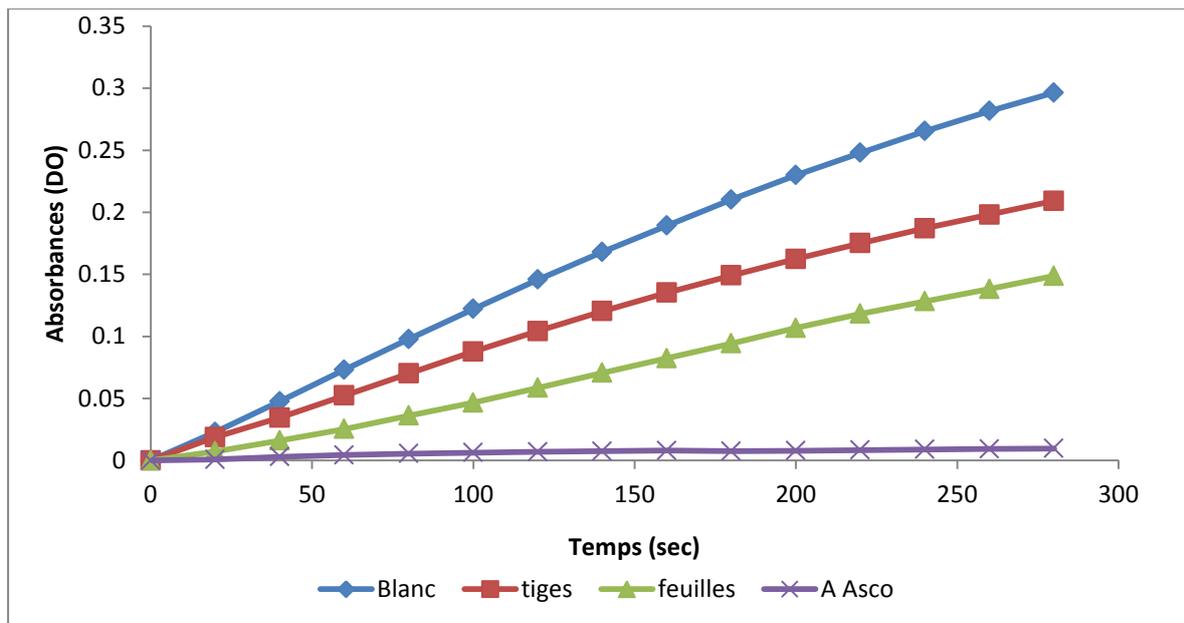


Figure 25: Variation de l'absorbance en fonction du temps de gaiacoquinone en présence et en absence des extraits méthanoliques de marrube à 500 µg/ml

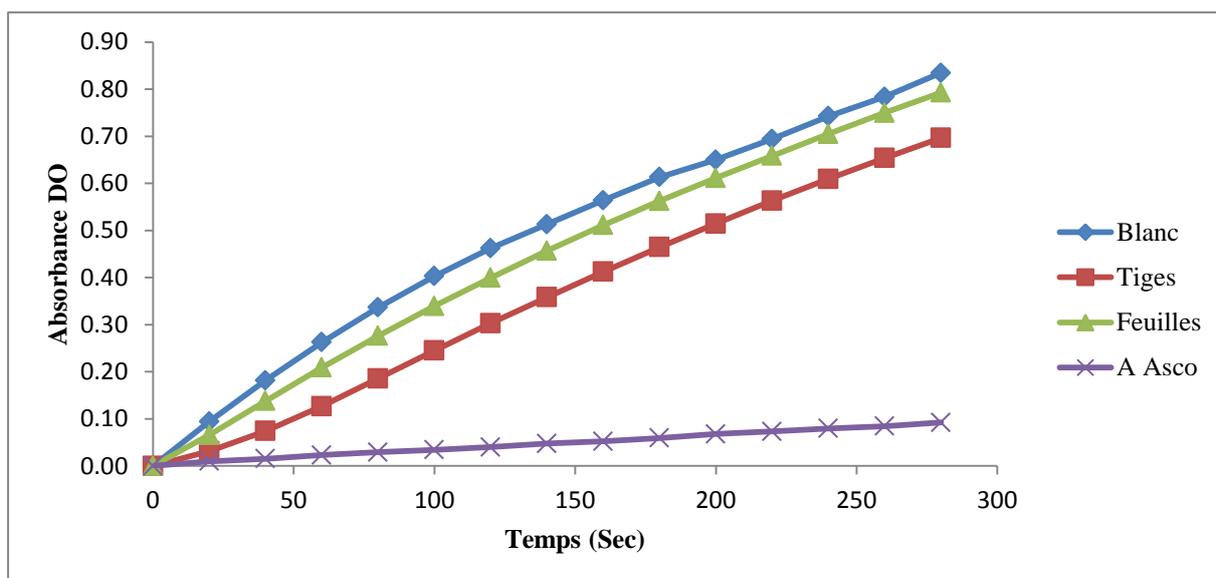


Figure 26: Variation de l'absorbance en fonction du temps de gaiacoquinone en présence et en absence des extraits aqueux de marrube à 500 µg/ml

La plus grande activité anti peroxydase des extraits de notre plante est observée dans le cas des extraits méthanoliques principalement ceux des feuilles avec un pourcentage d'inhibition allant jusqu'à 42,68 % et celui des tiges et de 28,52 % avec une concentration de 500 µg/ml. En ce qui concerne les extraits aqueux, les pourcentages inhibition observés tout en étant faibles (22,73 % et 11,40 %) pour les feuilles et pour les tiges respectivement) restent

inférieurs à ceux obtenus avec les extraits méthanoliques et avec les standards qui présente un taux d'inhibition de l'ordre de 89, 85 % avec seulement une concentration de 100 µg /ml.

Ponce., et al, (2004) ont montré que les huiles essentielles de *M. vulgare* inhibent l'activité peroxydase de chou, de cardon, d'épinard et de laitue. Les études réalisées par **Pouranvari., et al, (2011)** montrèrent une différence d'efficacité inhibitrice de l'activité de peroxydase de chou par les extraits de plante de genres différents de citrus.

L'inhibition du brunissement peut être due à une inhibition directe de l'enzyme ou par réduction et piégeage des quinones, c'est le cas de la vitamine C, résultant de l'oxydation des polyphénols (**Hemeda, 1990**).

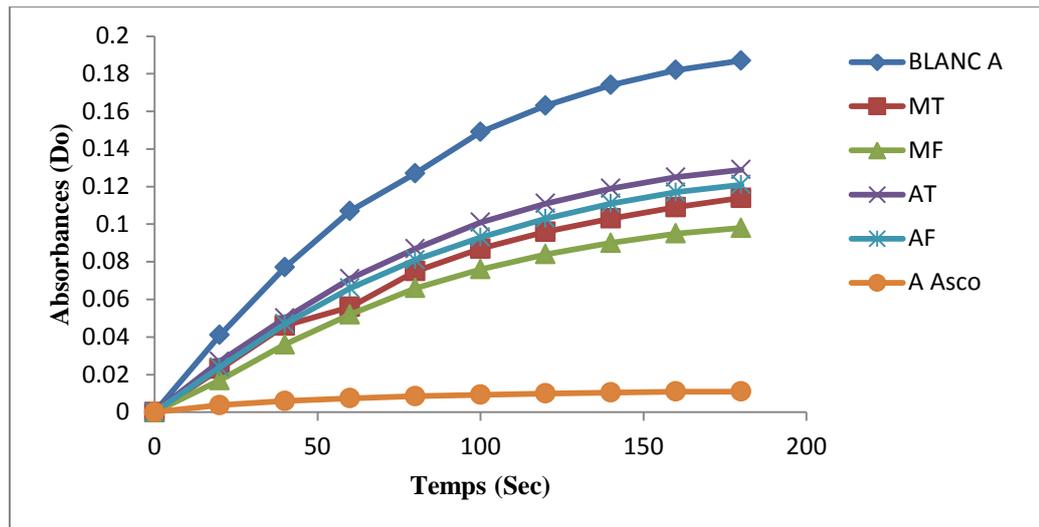
Les différents potentiels d'inhibition de nos extraits peuvent être attribués à la présence et à la variabilité en substances bioactives en termes de nature et de quantité. D'autre part, que ce soit pour les extraits méthanolique ou aqueux de marrube, l'efficacité d'inhibition dépend aussi de la source de l'extrait enzymatique utilisée. Cette variabilité d'action peut s'expliquer par l'existence de plusieurs formes d'enzymes (iso-enzymes) dans un même végétal et au niveau d'un même tissu, ainsi que par la différence de leurs propriétés physico-chimiques et catalytiques. Le pH et la température des milieux réactionnels peuvent influencer également la spécificité des POD d'une manière non négligeable (**Klein., et al, (1989)**).

Ces résultats peuvent être due à la présences des composés phénoliques dans les extraits de *Marrubium vulgare* qui sont structurellement analogues au substrat de la peroxydase (le gaïacol). Cette analogie leur confère une activité inhibitrice vis-à-vis de l'enzyme.

II.5.2 Activité anti-polyphénoloxydase

L'activité anti-PPO des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles et des tiges de *Marrubium vulgare L* a été testée pour les PPO extraites des de chou rouge.

Les résultats obtenus montrent qu'en présence des extraits aqueux et méthanolique ont à observer une diminution de l'activité de ces enzymes (figure 27).



MT : extrait méthanolique feuille, MF : extrait méthanolique feuille, AT : extrait aqueux tige, AF : extrait aqueux feuille.

Figure 27: Variation de l'absorbance en fonction du temps de l'activité des polyphénoxydases en présence et en absence des extraits aqueux de marrube à 500 µg/ml

La diminution de l'activité des enzymes varie en fonction de la partie de la plante utilisée ainsi que le solvant d'extraction (tableau VII). Pour une concentration d'extrait de 500 µg/ml, les taux d'inhibition les plus importants sont largement plus faibles que ceux dus à l'acide ascorbique (93,08 %).

Tableau VII : Taux d'inhibition des PPO par les extraits de *Marrubium vulgare* à 500 µg/ml

Extrait	Pourcentage d'inhibition
Extrait méthanolique feuille	51,40 %
Extrait aqueux feuille	38,38 %
Extrait méthanolique tige	47,68 %
Extrait aqueux tige	33,64 %
Acide Ascorbique	93,08 %

D'après les résultats obtenus, les extraits méthanolique des feuilles et tiges de *M. vulgare* de inhibent la PPO de chou rouge avec des taux de 51,40 % à 47,68 %

respectivement. Par contre dans le cas d'utilisation des extraits aqueux donnent des activités inhibitrices de l'ordre de 38,31 % pour les extraits aqueux des feuilles et de 33,64 % Pour les extraits des tiges.

Des études antérieures ont démontré que les antioxydants naturels agissent comme des inhibiteurs des PPO de fruits et de légumes. L'étude réalisée par **Kim., et al, (2005)** montre que les extraits d'oignon diminuent le taux du brunissement de la poire avec une efficacité allant jusqu'à 54,1 % en inhibant l'activité de la PPO. Ces résultats sont confortés par les travaux de **Lee., et al, (2007)** qui font montre que la PPO de taro est inhibée par les extraits d'oignon avec des taux de 54,8 % jusqu'à 68,5 %. D'autres études ont également rapporté des effets similaires lors de l'utilisation d'extraits naturels sur l'activité des PPO de plantes, la différence de taux d'inhibition d'un extrait à un autre et d'une source enzymatique à une autre peut s'expliquer par la présence de plusieurs formes d'enzymes (iso-enzymes) dans l'extrait enzymatique qui présente des spécificités et des propriétés structurales et physico-chimiques variables et/ou par la nature des molécules actives des extraits inhibiteurs d'origine végétale (**Espin., et al, 1999**).

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

La présente étude avait pour objectif principal l'évaluation de l'activité antioxydante et anti enzymes de brunissement des extraits de feuilles et de tige de l'espèce *Marrubium vulgare* de la région de Bouira.

Les essais phytochimiques ont révélé la présence de nombreux métabolites: polyphénols, flavonoïdes, tanins, et les flavonols. Et leurs teneurs varient d'un extrait à l'autre et d'une partie à l'autre.

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux, par la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé que l'extrait feuilles méthanolique de l'espèce *Marrubium vulgare* est plus riche en polyphénols ($35.36 \pm 0,92$ mgEAG/g MS), de même les deux tests d' $AlCl_3$ ont confirmé leur richesse en flavonoïdes, en flavonols, avec des taux de 20.56 ± 0.54 , 23.8 ± 0.81 EQ/g MS, respectivement. Par contre la méthode de la vanilline a révélé que l'extrait des tiges aqueux est plus riche en tannins ($72,82 \pm 0,772$ mg EC/g MS). Et comme l'indique l'analyse statistique de corrélation, il semblerait que les composés phénoliques, aussi bien dans l'extrait aqueux que méthanolique, sont en majorité des flavonoïdes ($r = 0.664$).

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits méthanoliques et aqueux par mesure de l'activité anti-radicalaire (test DPPH, test ABTS) a montré que les extraits méthanoliques des meilleures activités que les extraits aqueux quelle que soit la partie de marrube utilisée. La meilleure activité anti-radicalaire a été observée pour les extraits des feuilles avec des IC50 pour piéger le radical DPPH de $25 \mu\text{g/ml}$ et $20.83 \mu\text{g/ml}$ respectivement, et pour piéger le radical ABTS de $67.14 \mu\text{g/ml}$ et $76.190 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Cependant, la quasi-totalité des différents extraits de *M vulgare* présentent un

pouvoir réducteur (test FRAP) de même ordre de grandeur que ce soit pour l'extrait aqueux que pour l'extrait méthanolique. Toutes fois, et bien que son activité réductrice soit largement inférieure à celle de la BHA, l'extrait méthanolique des feuilles de *Marrubium vulgare*, présente le plus fort taux réducteur.

Le test de blanchiment de β carotène montre que les extraits de feuilles sont plus efficaces que les autres extraits avec des valeurs de 118.75 et 140.625 $\mu\text{g/ml}$.

D'autre part, nous avons évalué l'effet anti- peroxydase et anti-polyphénoloxydase, enzymes impliquées dans le brunissement enzymatique, des extraits de différentes parties de marrube. Il a été démontré que la majorité des extraits méthanoliques ou aqueux présentent un effet inhibiteur des peroxydases extraites de chou rouge.

Les extraits de feuilles méthanolique et de tiges présentent le meilleure pourcentage d'inhibition allant jusqu'à 42,68 % et de 28,52 % ($\mu\text{g/ml}$) respectivement avec néanmoins, une plus grande efficacité pour les extraits méthanoliques. Par contre notre extrait inhibe la PPO qui existe dans le chou avec des taux de 51,40 % à 47,68 % respectivement. Pour une concentration maximale d'extraits aqueux (500 $\mu\text{g/ml}$).

Il serait donc intéressant de procéder à une caractérisation qualitative, des extraits des feuilles et des tiges de *Marrubium vulgare* principalement en métabolites du type secondaires comme les polyphénols, flavonoïdes et autres. Puis identifier et isoler les principes actifs responsables des effets antioxydants et anti-enzymatiques. Des études plus approfondies in vivo seraient nécessaires dans les années à venir pour mieux comprendre le mécanisme d'action des molécules bioactives, 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.

Références Bibliographiques

- **Abadi, A., et Hassani A. (2013).** "Chemical composition of *Marrubium vulgare L.* essential oil from Algeria." International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy **8**(3): 210-214.
- **Ahmed, B., Masoodi MH., et al. (2008).** A new monoterpene acid from *Marrubium vulgare* with potential antihepatotoxic activity. Nat ProdRes 24: 1671–80.
- **Alkhatib, R., Joha, S. et al. (2010).** "Activity of ladanin on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare*." Planta medica **76**(01): 86-87.
- **Aruoma, O., (1999).** "Free radicals, antioxidants and international nutrition*." Asia Pacific journal of clinical nutrition **8**(1).
- **Arvouet-Grand, A., Vennat, B et al. (1994).**"Standardization of propolis extract and identification of principal constituents."Journal de pharmacie de Belgique **49**(6): 462-468.
- **Ashie, I., Simpson, B. et al. (1996).** "Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods." Critical Reviews in Food Science & Nutrition **36**(1-2): 1-30.
- **Baliga, M., Baliga, V.et al. (2011).** "A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (*Phoenix dactylifera L.*)." Food research international **44**(7): 1812-1822.
- **Barba, F., Orlie, V. et al. (2016).** Implementation of Emerging Technologies. Innovation Strategies in the Food Industry, Elsevier: 117-148.
- **Bellakhdar, J., (1997).** "La pharmacopée marocaine traditionnelle."
- **Belhattab R., et Larous, L (2006).** Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubiumvulgare L.* growing wild in Algeria. J EssentOilRes 18: 369–73.
- **Bellakhdar, J., (1997).** Médecine arabe ancienne et savoirs populaires :la pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis Press, Paris.
- **Bensalah, F., (2014).** Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare L.*
- **Bonnaillie, C., Salacs, M., et al. (2012).** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea L.*).
- **Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P. et al. (2003).** "Radicaux libres et anti-oxydants." Médecine-Sciences, Flammarion.

- **Bonnier, G., et Layens, D. (1909).** "Flore complète portative de la France de la Suisse et de la Belgique, Librairie Générale de l'Enseignement, Paris.(1991): Claves para la determinación de plantas vasculares. Barcelona, Ed." Omega.
- **Boudjelal A., Henchiri C., et al. (2012).** Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare L.* infusion. *Fitoterapia* 83 : 286–292.
- **Bouhadjra, K., (2011).** Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, UMMTO.
- **Bouterfas, K., Mehdadi, Z., et al. (2014).** Optimization of extraction conditions of some phenolic compounds from white horehound (*Marrubium vulgare L.*) leaves. *International Journal of Organic Chemistry*, 4, 292.
- **Bouterfas, K., Mehdadi, Z., et al. (2013).** Quantification de quelques polyphénols de *Marrubium vulgare L.* du mont de Tessala (Algérie occidentale) pendant les deux périodes de végétation et de floraison. *Les technologies de laboratoire*, 8.
- **Bouzouita, N., Kachouri, F., et al. (2008).** "Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*." *J. Soc. Chim. Tunis* 10: 119-125.
- **Bruneton, J., (1999).** Pharmacognosie Phytochimie plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc, Paris.
- **Cheftel, C., Cheftel, H. et al. (1976).** "Introduction a la biochimie et a la technologie des aliments-v. 1-2."
- **Chen, L., A. Mehta, et al. (2000).** "Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates." *Journal of agricultural and food chemistry* 48(10): 4997-5000.
- **Chew, K., Khoo M., et al. (2011).** "Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Ortho siphon stamineus* extracts." *International Food Research Journal* 18(4).
- **Chock, A., (2000).** Étude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis L.*) du Maroc Study of antioxidant activity and anticorrosion action of the methanol extract of dwarf palm leaves (*Chamaerops humilis L.*) from Morocco.
- **Coe, S., Fraser A., et al. (2013).** "Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green, and white teas." *International journal of food science*.

- **Corban, G. J., Hadjikakou S. K., et al. (2011).** "Inhibition of Peroxidase-Catalyzed Iodination by Thioamides. Experimental and Theoretical Study of the induced Antithyroid Activity of thioamides."
- **Dey, P., et Harborne, J. (2012).** Methods in plant biochemistry: Terpenoids, Academic press.
- **Delannoy, É., Marmey, P., et al. (2004).** "Les peroxydases végétales de classe III." Acta botanica gallica **151**(4): 353-380.
- **Djahra, A., (2014).** Etude phytochimique et activité antimicrobienne antioxydante antihépatotoxique de Marrube blanc ou *Marrubium vulgare L*, Thèse de doctorat Unique. Université Badji Mokhtar–Annaba (Algérie) 114p.
- **Diallo, A., (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd.(Myrtaceae), Thèse. Université de Bamako, Mali: Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odoto-Stomatologie.
- **Di Matteo, V., et Esposito E., (2003).** "Biochemical and therapeutic effects of antioxydants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis." CURRENT DRUG TARGETS-CNS AND NEUROLOGICAL DISORDERS- **2**(2): 95-108.
- **Dransfield, G., Guest P., et al. (2000).** "Photoactivity tests of TiO₂-based inorganic sunscreens: Part 1: Non-aqueous dispersions." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **59**(1-3): 147-151.
- **El Alami, A., Loubna, F. et al. (2016).** "Etude ethnobotanique sur les plantes médicinales spontanées poussant dans le versant nord de l'Atlas d'Azilal (Maroc)." Algerian Journal of Natural Products **4**(2): 271-282.
- **Eskin, N. (1990).** M. Biochemistry of food spoilage: enzymatic browning, Biochemistry of Foods, New York, Academic Press.
- **Espin, J.C., Jolivet, S., et al. (1999).** Agaritine from *Agaricus bisporus* is capable of preventing melanin formation. Phytochemistry, **50** : 555-556.
- **Faguy, D. M., et W. F. Doolittle (2000).** "Horizontal transfer of catalase-peroxidase genes between archaea and pathogenic bacteria." Trends in Genetics **16**(5): 196-197.
- **Falleh, H., Ksouri, R. et al. (2008).** "Phenolic composition of *Cynaracardunculus L.* organs, and their biological activities." Comptes Rendus Biologies **331**(5): 372-379.
- **Favier, A. (2003).** "Le stress oxydant." L'actualité chimique **108**

- **Fidjel, Y. (2016).** Diagnostique pour la mise en place d'une démarche qualité dans la laiterie ENNADJAH-MAGHNIA.
- **Floegel, A., Kim, D.O., et al. (2011).** Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1043-1048.
- **Georgé, S., Brat, P. et al. (2005).** "Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(5): 1370-1373.
- **Ghedadba, N., (2018).** Contribution à l'étude de l'activité biologique des deux espèces de *Marrubium vulgare L* et *Marrubium deserti* de Noé in vitro et in vivo. Université de Batna 2.
- **Ghedadba, N., Bousselela, H., et al. (2014).** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare L*. *Phytothérapie*, 12, 15-24.
- **Ghedadba, N., Hambaba, L., et al. (2014).** Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare L*. *Algerian Journal of Natural Products*, 2, 64-74.
- **Ghoul, M. et Chebil, L. (2012).** Enzymatic polymerization of phenolic compounds by oxidoreductases. *Enzymatic polymerization of phenolic compounds by oxidoreductases*, Springer: 1-46.
- **Harel, E., Mayer, A. et al. (1970).** "Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 21(10): 542-544.
- **Hayat, K., Hussain, S., et al (2009).** Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation and Purification Technology*, 70, 63-70.
- **Heim, E., Tagliaferro, A., R. et al. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13, 572-584.
- **Hemeda, H. Klein, M. (1990).** Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *Journal of Food Science*, 55, 184-185.
- **Hiraga, S., Sasaki, K. et al. (2001).** "A large family of class III plant peroxidases." *Plant and Cell Physiology* 42(5): 462-468.
- **Lounassi, I., et Bensania, Y. (2013).** Étude de l'activité antioxydante de la plante *Limonium guyonianum*.

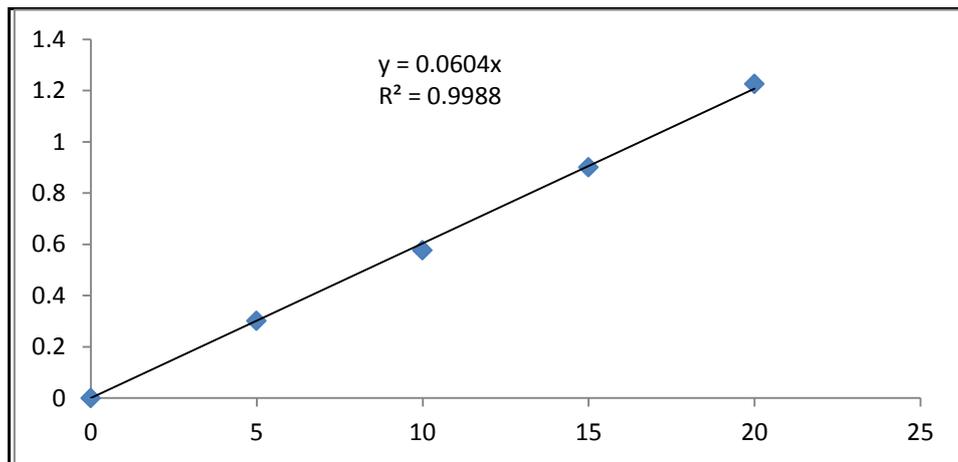
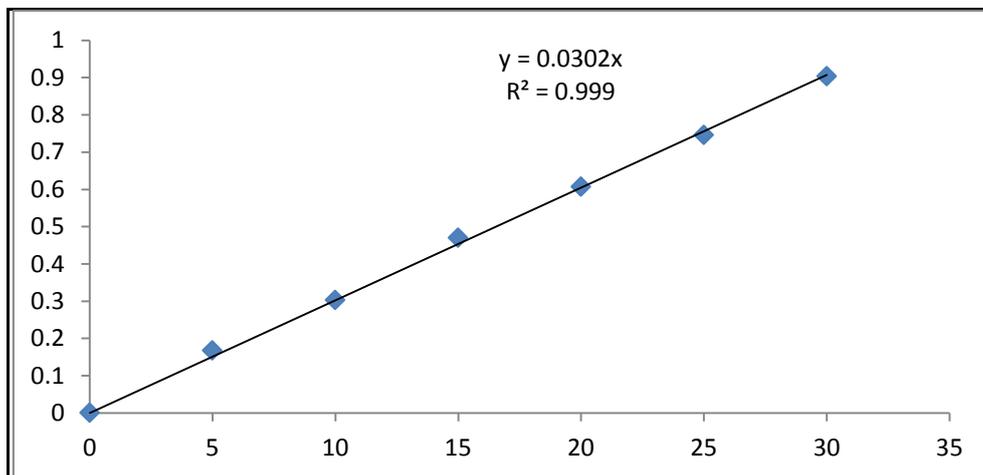
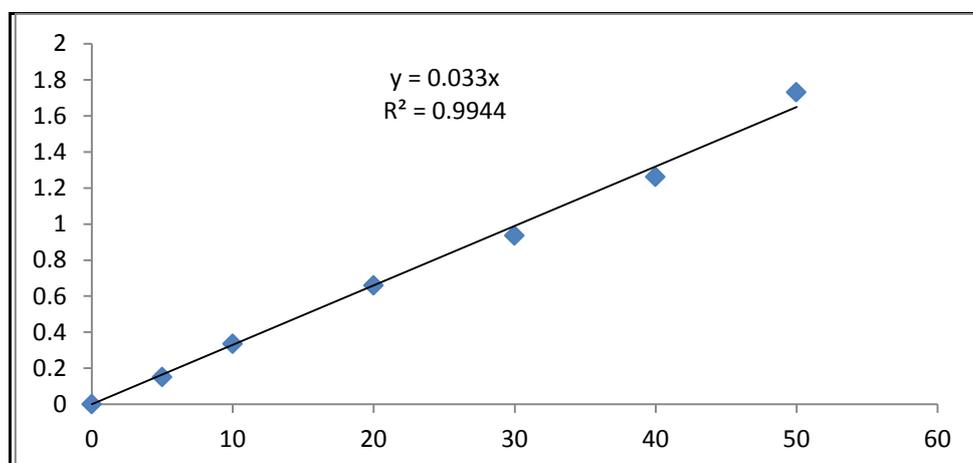
- **Judd, S., Campbell, C. et al (2002).** Botanique systématique: une perspective phylogénétique, De Boeck Supérieur.
- **Joslyn, M. et Ponting, J. (1951).** Enzyme-catalyzed oxidative browning of fruit products. *Advances in Food Research*, Elsevier. **3**: 1-44.
- **Khanbabae, K. and T. van Ree (2001).** "Tannins: classification and definition." *Natural product reports***18**(6): 641-649.
- **Kadri, N., Tighilet, K., (2017).** Phenolic compounds from Citrus leaves: antioxidant activity and enzymatic browning inhibition. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14.
- **Kim, M.J., Kim, C.Y., et al (2005).** Prevention of enzymatic browning of pear by onion extract. *Food Chem*, 89(2) : 181-184.
- **Klein, L., Shmunes, E., et al (1989).** Linear IgA bullous dermatosis related to captopril treatment. *Cutis*, 44, 393-396.
- **Koechlin-Ramonatxo, C., (2006).** "Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires." *Nutrition clinique et métabolisme* **20**(4): 165-177.
- **Koleva, I., Van Beek, A. et al. (2002).** "Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods." *Phytochemical analysis***13**(1): 8-17.
- **Kumaran, A., et Karunakaran, J. (2007).** "In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India." *LWT-Food Science and Technology***40**(2): 344-352.
- **Larousse des plantes médicinales (2001).** Identification, préparation, soins. Edition Larousse, livre de 335 pages.
- **Lee, C. Y. et Whitaker R. (1995).** Enzymatic browning and its prevention, ACS Publications.
- **Lee, M.Y., Lee, M.K., et al., (2007).** Inhibitory effect of onion extract on polyphenoloxidase and enzymatic browning of taro (*Colocasia antiquorum* var. *esculenta*). *Food Chem*, 105 : 528-532.
- **Lehucher-Michel, M., Lesgards, J. et al., (2001).** "Stress oxydant et pathologies humaines: Bilan et perspectives préventives." *La Presse médicale* **30**(21): 1076-1081.

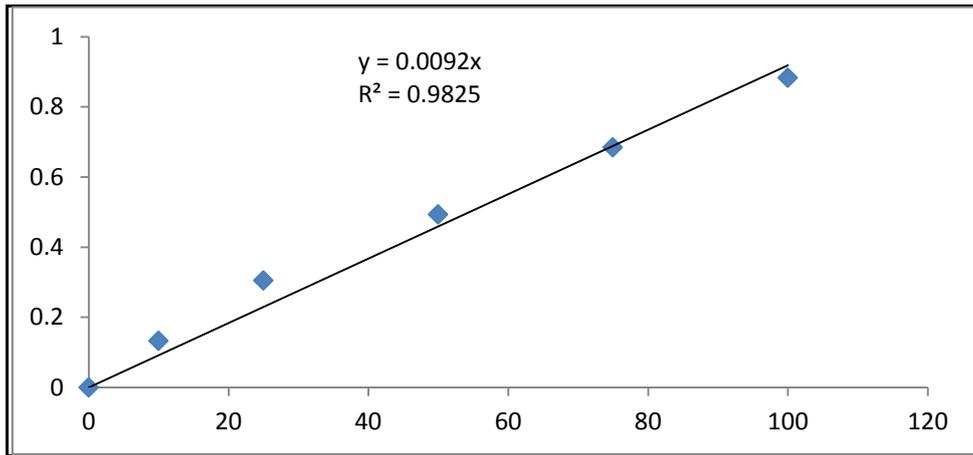
- **Lien, E., Sellati, T. J. et al. (1999).** "Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products." *Journal of Biological Chemistry* **274**(47): 33419-33425.
- **López-Nicolás, J. M., Núñez-Delicado, E. et al. (2007).** "Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: the use of maltosyl- β -cyclodextrin as secondary antioxidant." *Food chemistry* **101**(3): 1164-1171.
- **Lopez-Serrano, M. et Ros Barceló, A. (2002).** "Comparative study of the products of the peroxidase-catalyzed and the polyphenoloxidase-catalyzed (+)-catechin oxidation. Their possible implications in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) browning reactions." *Journal of agricultural and food chemistry* **50**(5): 1218-1224.
- **Macheix, J., A. Fleuriet, et al. (1990).** "Phenolic compounds in fruit processing." *Fruit phenolics* **1**: 295-358.
- **Macheix, J., A. Fleuriet, et al. (2006).** "Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire." Ed Tec & Doc Lavoisier: 1-25.
- **Mahmoudi, S., Khali, M. et al. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus L.*). *Nature & Technology*, 35.
- **Manian, R., Anusuya, N. et al. (2008).** "The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L." *Food chemistry* **107**(3): 1000-1007.
- **Mann, H. S., Alton, J. et al. (2008).** "Differential expression of cell-wall-modifying genes and novel cDNAs in apple fruit during storage." *Journal of the American Society for Horticultural Science* **133**(1): 152-157.
- **Marshall, M., Jeongmok, K. et al. (2006).** *Enzymatic Browning in fruits, vegetables and seafoods*. FAO, Rome.
- **Martin-Nizard, F., Sahpaz, S., et al. (2003).** Natural phenylpropanoids protect endothelial cells against oxidized LDL-induced cytotoxicity. *Planta medica*, 69, 207-211.
- **Martinez, C., (1997).** "Rôle des peroxydases dans la résistance du cotonnier à la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum*."
- **Martinez, M., et Whitaker, J. R. (1995).** "The biochemistry and control of enzymatic browning." *Trends in Food Science & Technology* **6**(6): 195-200.
- **Marusek, C. M., Trobaugh, N. M. et al. (2006).** "Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species." *Journal of inorganic biochemistry* **100**(1): 108-123.

- **Masuda, T., et Yonemori, S. et al. (1999).** "Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(4): 1749-1754.
- **Matheis, G. et Whitaker, J. R. (1984).** "Peroxidase-catalyzed cross linking of proteins." *Journal of protein chemistry* **3**(1): 35-48.
- **Mayer, A. M. (2006).** "Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review." *Phytochemistry* **67**(21): 2318-2331.
- **McEvily, A. J., Iyengar, R. et al. (1992).** "Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages." *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* **32**(3): 253-273.
- **Nawwar, M. A., El-mousallamy, A. et al (1989).** Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, 28, 3201-3206.
- **Nicholson, R. et W. Vermeris (2006).** *Phenolic Compound Biochemistry*, Netherlands: Springer.
- **Nicolas, J. J., Richard-Forget, F. C. et al. (1994).** "Enzymatic browning reactions in apple and apple products." *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* **34**(2): 109-157.
- **Paolini, J., (2008).** Detailed analysis of the essential oil from *Cistus albidus L.* by Chapitre IV: Activité biologique 146 combination of GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR spectroscopy. *Natural Product Research*. 22 (14): 1270-1278.
- **Perez, Y., Jimenez-Ferrer, E. et al. (2010).** "*Citrus limetta* leaves extract antagonizes the hypertensive effect of angiotensin II." *Journal of ethnopharmacology* **128**(3): 611-614.
- **Perry, C. R., Matcham, S. E. et al. (1993).** "The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*." *Microbiology* **139**(1): 171-178.
- **Pincemail, J., K. Bonjean, et al. (2002).** "Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante." *Nutrition clinique et métabolisme* **16**(4): 233-239.
- **Ponce, A., C. Del Valle, et al. (2004).** "Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables." *LWT-Food Science and Technology* **37**(2): 199-204.
- **Ponce, M. A., Scervino, J. M., et al. (2004).** Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens* (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Phytochemistry*, 65, 1925-1930.

- **Pouranvari, M., Mousavizadeh, S., et al. (2011).** Influence of fusion zone size and failure mode on mechanical performance of dissimilar resistance spot welds of AISI 1008 low carbon steel and DP600 advanced high strength steel. *Materials & Design*, 32, 1390-1398.
- **Pukalskas, A., Van beek, A. et waard, P. (2005).** Development of a triple hyphenated HPLC–radical scavenging detection–DAD–SPE–NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts. *Journal of Chromatography A*, 1074, 81-88.
- **Quézel, P., et Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
- **Raynaud, J., (2007).** Prescription et conseil en phytothérapie. Tec & Doc, Paris, pp. 148 – 9
- **Pellegrini, N. (1999).** "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free radical biology and medicine* 26(9-10): 1231-1237.
- **Rapeanu, G., Van Loe y., et al. (2006).** "Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*)."
Food chemistry 94(2): 253-261.
- **Robinson, D. (1991).** "Peroxidases and catalases in foods." *Oxidative enzymes in foods*: 1-48.
- **Salah, N., Miller, N., et al. (1995).** "Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants." *Archives of biochemistry and biophysics* 322(2): 339-346.
- **Schuller, D. J., Ban N., et al. (1996).** "The crystal structure of peanut peroxidase." *Structure* 4(3): 311-321.
- **Singleton, V. L. et Rossi, J. A. (1965).** "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents." *American journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144-158.
- **Stankovic, M. S., (2011).** Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum L.* extracts. *Kragujevac J Sci*, 33, 63-72.
- **Šukalović, V., et Vuletić M., (2003).** "The characterization of peroxidases in mitochondria of maize roots." *Plant science* 164(6): 999-1007.
- **Toivonen, P. M., et Brummell, D. A. (2008).** "Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables." *Postharvest Biology and Technology* 48(1): 1-14.

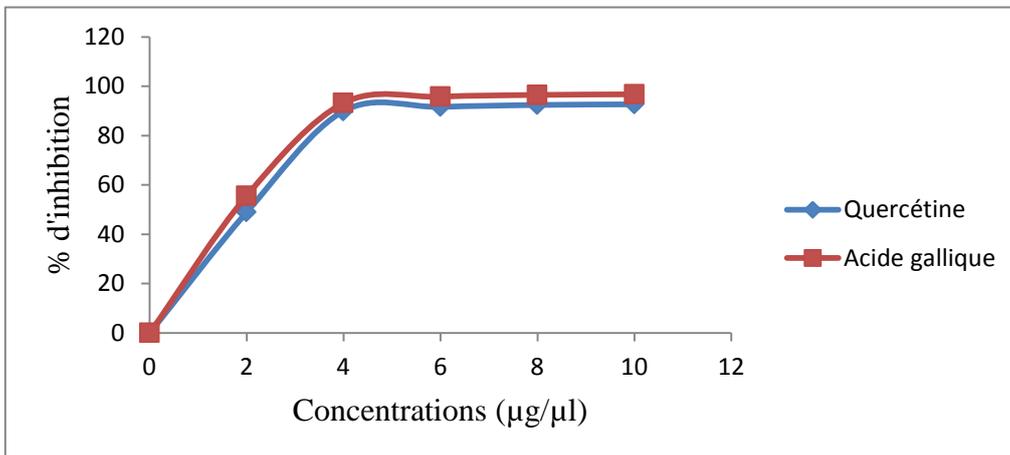
- **Tomás-Barberán, F. A., et Espin J. C (2001).** "Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**(9): 853-876.
- **Turrens, J. F., Alexandre, A., et al. (1985).** "Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria." *Archives of biochemistry and biophysics* **237**(2): 408-414.
- **Valko, M., Rhodes, C., et al. (2006).** "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chemico-biological interactions* **160**(1): 1-40.
- **Vámos-Vigyázó, L. et Haard, N. F. (1981).** "Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables." *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* **15**(1): 49-127.
- **Van acker, s. A., Tromp, N., et al . (1996).** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 331-342.
- **Van den berg, R., Haenen, R., et al. (1999).** Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food chemistry*, 66, 511-517.
- **Vergara-Galicia, J., Aguirre-Crespo, F., et al. (2012).** Acute hypoglycemic effect of ethanolic extracts from *Marrubium vulgare*. *Phytopharmacology* 3: 54–60.
- **Walker, R., (1976).** "The control of enzymic browning in fruit juices by cinnamic acids." *International Journal of Food Science & Technology* **11**(4): 341-345.
- **Walker, J. R. et Ferrar, P. H. (1998).** "Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance." *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **15**(1): 457-498.
- **Welinder, G., (1992).** Plant peroxidases: structure-function relationships. *Plant Peroxidases 1980-1990, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects*: 1-24.
- **Woodville, W., (1810).** Medical botany.
- **Xu, G., et Chen, J. (2008).** Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis Hort. ex Tanaka*) and Huyou (*Citrus paradisi Macf.* Changshan Huyou) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 382-389.
- **Zheng, W., et Wang, S. Y., (2001).** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 5165-5170.
- **Zou, Y., et Wei, D. (2004).** Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum L.* in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 5032-5039.

Annexe I: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.**Annexe I.1:** Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols.**Annexe I.2:** Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.**Annexe I.3:** Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonols.

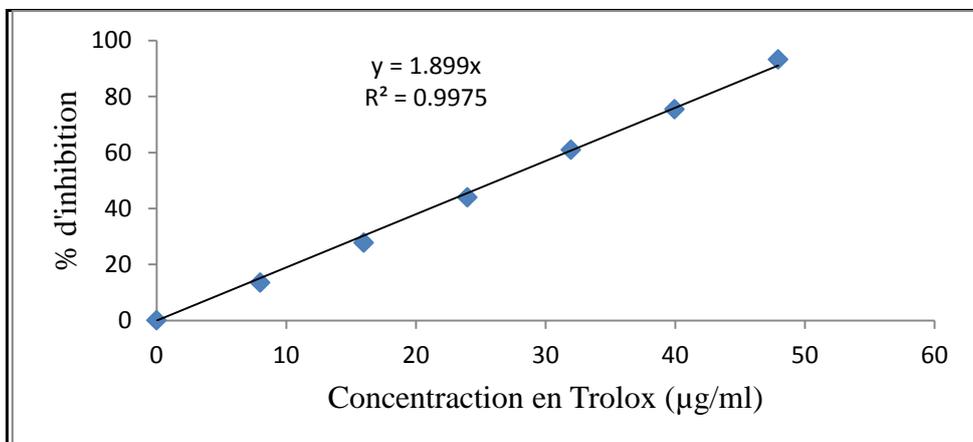


Annexe I.4: Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés.

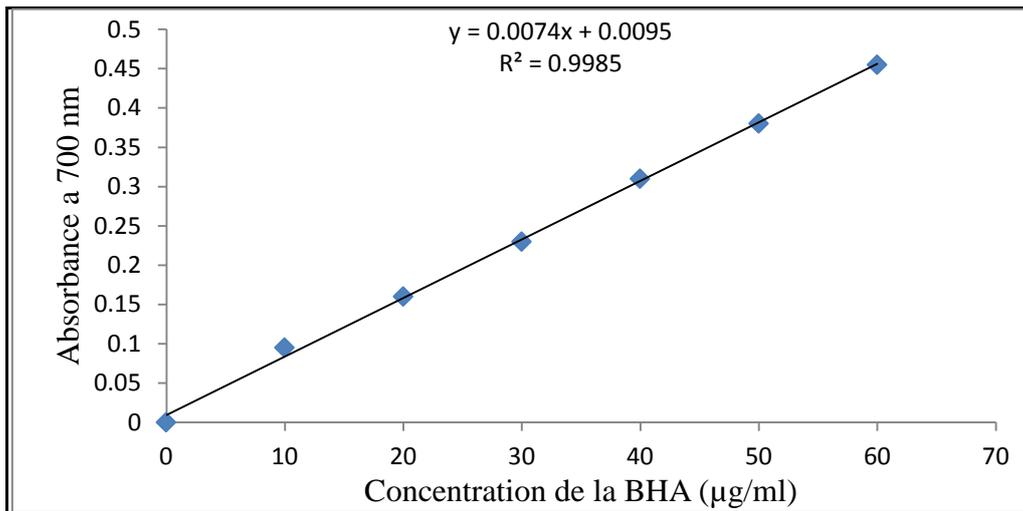
Annexe II : Courbes d'étalonnages des activités antioxydantes.



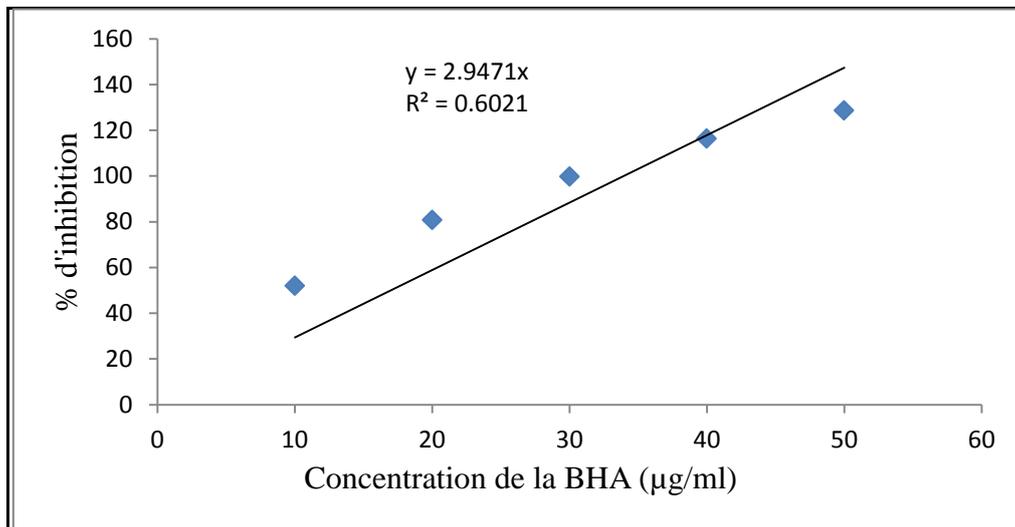
Annexe II.1: Courbe d'activité scavenging du radical DPPH des standards (Quercétine et l'Acide Gallique).



Annexe II.2: Courbe d'étalonnage de Trolox.



Annexe II.3 : Courbe d'étalonnage de la BHA pour le pouvoir réducteur.



Annexe II.4 : Courbe d'étalonnage de la BHA pour le blanchiment de β -carotène

Résumé.....

Durant ces dernières décennies, un intérêt majeur est accordé aux plantes médicinales en vue de leurs propriétés thérapeutiques démontrées. Une étude quantitative de l'espèce *Marrubium vulgare L* a été réalisée par le dosage spectral des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes, flavonols et tanins) des extraits de feuilles et tiges. Par la suite, l'activité antioxydante (DPPH, ABTS, le pouvoir réducteur et blanchiment au B-carotène) ainsi que l'activité anti-péroxydase et anti-polyphénoloxydase de ces extraits ont été évaluées. De point de vue quantitatif, les extraits méthanoliques des feuilles sont les plus riches en polyphénols accompagnés par des teneurs très élevées en flavonoïdes et aussi la richesse des tiges aqueux en tannins condensés. Les résultats obtenus de l'activité antioxydante indiquent que le pouvoir antioxydant le plus élevé est manifesté par les extraits des feuilles. Cependant, cette dernière est plus importante dans les extraits méthanoliques que dans les extraits aqueux. Enfin, l'évaluation de l'activité anti-péroxydase indique que les feuilles et les tiges sont habiles à inhiber les peroxydases. Par contre, les extraits aqueux et méthanoliques exercent une faible inhibition sur les polyphénoloxydases.

Mots clés : *Marrubium vulgare*, stress oxydatif, polyphénols, activité antioxydante, peroxydase, polyphénoloxydase.

Abstract.....

During these last decades, a major interest is granted to the medicinal plants with a view to their proven therapeutic properties. In this study, *Marrubium vulgare L* species were analyzed. Firstly, a quantitative study was carried out by the spectral assay of phenolic compounds (total polyphenols, flavonoids, flavonols and tannins) extracts of leaves and stalks. Subsequently, the antioxidant activity (DPPH radical, ABTS, FRAP and B-carotene bleaching) as well as the anti-peroxidase and anti-polyphenoloxidase activity of these extracts were evaluated. From a quantitative point of view, the methanolic extracts of the leaves are the richest in polyphenols accompanied by very high flavonoid contents and also the richness of the aqueous stems in condensed tannins. The results obtained from the antioxidant activity indicate that the highest antioxidant power is manifested by the leaf extracts.. However, the latter is more important in the methanolic extracts than in the aqueous extracts. Finally, evaluation of the anti-peroxidase activity indicates that the leaves and stems are skilled at inhibiting peroxidases. However, the aqueous and methanolic extracts exert a weak inhibition on the polyphenoloxidases.

Key words : Horehound, oxidative stress, polyphenols, antioxidant activity, peroxidase, polyphenol oxidase.

ملخص.....

في الأونة الأخيرة ارتفع الاهتمام بالنباتات الطبيعية نظرا للخصائص الصحية التي تتمتع بها. في هذه الدراسة، تم تحليل نبتة *Marrubium vulgare L*. أولاً، تم إجراء دراسة كمية من خلال الفحص الطيفي للمركبات الفينولية (مستخلصات البوليفينول وفلافونيدات وفلافونول والتانينات) من أوراق وسيقان المريوة. ثانياً، تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة (DPPH، ABTS، B-carotène، FRAP) و في الأخير تمت دراسة نشاط مضاد peroxydase ومكافحة polyphenoloxidase من هذه المقتطفات. من وجهة النظر الكمية، فإن المستخلصات الميثانولية من الأوراق هي الأغنى في مادة البوليفينول المصحوبة بمحتويات فلافونويد عالية جداً وأيضاً ثراء السيقان المائية في التانينات المكثفة. النتائج التي تم الحصول عليها من نشاط مضادات الأكسدة تشير إلى أن أعلى قوة مضادة للأكسدة يتجلى في مقتطفات الاوراق الميثانولية. وأخيراً، يشير تقييم نشاط مضاد peroxydase إلى أن الأوراق والسيقان قادرة على تثبيطه. ولكن من ناحية أخرى، تمارس المستخلصات المائية والميثانولية تثبيطاً ضعيفاً على polyphenoloxidase.

مفتاح الكلمات: المريوة، عديد الفينول، الفعالية ضد الأكسدة، البيروكسيداز، بوليفينول أكسيداز.