

Article original

Pharmacognosie

Pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. en provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale)

K. Bouterfas¹, Z. Mehdadi¹, A. Latreche¹, L. Aouad²

¹Laboratoire de biodiversité végétale : conservation et valorisation, faculté des sciences de la nature et de la vie, université Djillali-Liabès, BP 89, Haï Larbi Ben M'Hidi, Sidi Bel Abbès, 22000, Algérie

²Laboratoire de synthèse de l'information environnementale, faculté de médecine, université Djillali-Liabès, Sidi Bel Abbès, 22000, Algérie

Correspondance : bouterfas_karim@yahoo.fr

Résumé : Cinq extraits flavonoïques obtenus des feuilles de *Marrubium vulgare* L. ont été testés sur quatre souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 1306 et *Staphylococcus aureus* ATCC 13565) et deux souches fongiques (*Penicillium digitatum* ATCC 201167 et *Aspergillus niger* ATCC 16404). Ils présentent un remarquable effet antibactérien sur les bactéries Gram+ et une activité antifongique modérée. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) varient entre 6,25 et 50 µg/ml en fonction de l'extrait flavonoïque et de la souche microbienne. Le screening phytochimique et la chromatographie sur couche mince (CCM) ont révélé l'existence de certaines classes flavonoïques qui pourraient être responsables du pouvoir antimicrobien de *Marrubium vulgare* L.

Mots clés : Pouvoir antimicrobien – Flavonoïdes – *Marrubium vulgare* L. – Screening phytochimique – CCM – CMI

Antimicrobial Power of the Flavonoids Extracted from the Leaves of *Marrubium vulgare* L. Coming from the Mount of Tessala (Western Algeria)

Abstract: Five flavonoid extracts obtained from the leaves of *Marrubium vulgare* L. were tested on four bacterial strains (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 1306 and *Staphylococcus aureus* ATCC 13565) and two fungal strains (*Penicillium digitatum* ATCC 201167 and *Aspergillus niger* ATCC 16404). They present a remarkable antibacterial effect on the Gram+ bacteria and a moderate antifungal activity. The minimal inhibitory concentrations (MICs) vary between 6.25 and 50 µg/ml according to the flavonoid extract and microbial strain. The phytochemical screening and the thin layer chromatography (TLC) showed the existence of some classes of flavonoids being able

to be responsible for the antimicrobial power of *Marrubium vulgare* L.

Keywords: Antimicrobial power – Flavonoids – *Marrubium vulgare* L. – Phytochemical screening – TLC – MIC

Introduction

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est une pratique courante depuis des millénaires ; ce phénomène a eu un regain d'intérêt avec les premières recherches sur les propriétés antimicrobiennes des plantes utilisées en médecine traditionnelle, donnant une base scientifique à ces pratiques empiriques [24].

Les plantes de la famille des Lamiacées sont réputées actives contre une variété de micro-organismes par leurs composés phénoliques [46]. C'est le cas du marrube blanc ou marrube commun, *Marrubium vulgare* L., herbacée vivace assez commune dans la région méditerranéenne, de 30 à 80 cm de hauteur, d'aspect blanchâtre, à petites fleurs blanches, à odeur pénétrante légèrement musquée et à saveur chaude et amère. Cette plante est traditionnellement utilisée pour le traitement de divers maux : sifflements respiratoires, maladies urinaires, otites, ophtalmies [4]. En Algérie, le marrube blanc est utilisé en médecine folklorique contre la diarrhée, le diabète, le rhumatisme, le rhume et les douleurs respiratoires [3].

Sur le plan chimique, *Marrubium vulgare* L. est riche en diterpènes [14], en phényléthanoïdes glucosidiques [43], en tanins [21], en saponins [21] et en flavonoïdes [38] ; on lui reconnaît des propriétés antioxydantes [27,40], hypoglycémiantes [52] et antidiabétiques [7], analgésiques [12,29] et anti-inflammatoires [44].

En ce qui concerne les propriétés antimicrobiennes de *Marrubium vulgare* L., plusieurs travaux ont été focalisés surtout sur l'effet de ses huiles essentielles [56]. Dans d'autres études, l'activité antimicrobienne est déterminée sur des extraits obtenus en utilisant des solvants à différentes polarités : acétone [31], éthanol [15,33,46], méthanol [15,19,31,34,55], hexane [31] et l'eau [15,31,55].

Cependant, le pouvoir antimicrobien des flavonoïdes de *Marrubium vulgare* L. n'a pas été encore élucidé. C'est ce qui nous a incités, à travers ce travail, à l'évaluer à partir d'extraits de feuilles de *Marrubium vulgare* L. croissant en Algérie et particulièrement dans le mont de Tessala (Algérie occidentale).

Matériel et méthodes

Matériel biologique

L'identification botanique de la plante *Marrubium vulgare* L. a été faite par M. Mehdadi Zoheir, professeur au département des sciences de l'environnement, université Djillali-Liabès, Sidi Bel Abbès, Algérie. Un spécimen a été conservé au laboratoire de biodiversité végétale : conservation et valorisation.

Des feuilles de *Marrubium vulgare* L. ont été récoltées en novembre 2012 dans le mont de Tessala (Algérie occidentale). Elles ont été lavées à l'eau distillée, séchées à l'air libre et à l'ombre pendant une dizaine de jours puis broyées avec un broyeur à couteau muni d'un filtre à mailles.

Les souches microbiennes proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection) : quatre bactériennes (Gram- : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835 et *Escherichia coli* ATCC 25922, Gram+ : *Bacillus cereus* ATCC 1306 et *Staphylococcus aureus* ATCC 13565) et deux fongiques (*Penicillium digitatum* ATCC 201167 et *Aspergillus niger* ATCC 16404). Nous avons utilisé le milieu Mueller-Hinton (MH) pour la culture des bactéries et l'oxytétracycline-glucose-agar (OGA) pour les champignons.

Extraction des flavonoïdes

Les feuilles broyées ont été macérées dans un mélange méthanol/eau (7/3 : v/v) avec un rapport 1/10 (masse/v), sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est filtré sous vide, et le méthanol est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif. L'extrait obtenu correspond à l'extrait brut (EBr) des feuilles. Cinquante millilitres de cet extrait ont été congelés puis lyophilisés afin de déterminer le rendement d'extraction [26,28].

L'EBr restant a été extrait par l'hexane (1/1, v/v) plusieurs fois jusqu'à ce que la phase hexanique devienne transparente. Après évaporation à sec à l'évaporateur rotatif, on obtient un extrait hexanique (EHx). La phase aqueuse est ensuite extraite plusieurs fois par le chloroforme puis par l'acétate d'éthyle pour donner les extraits ECh et EAc. Ces

deux extraits sont évaporés à sec à l'évaporateur rotatif. Cinquante millilitres de chaque extrait concentré (EHx, ECh, EAc et la phase aqueuse résiduelle EAq) ont été congelés puis lyophilisés afin de déterminer les rendements d'extraction. Tous les lyophilisats ont été conservés à -20 °C jusqu'à leurs utilisations.

Rendements en flavonoïdes

Les différents extraits obtenus après lyophilisation sont pesés pour déterminer le poids sec résultant. Les rendements ont été rapportés à 100 g de poudre de feuilles.

Screening phytochimique

Les tests phytochimiques des différents extraits obtenus sont réalisés à base de précipitations ou de colorations caractéristiques en vue de s'assurer de la présence des flavonoïdes et de mettre en évidence des groupements chimiques qui peuvent être présents dans ces extraits flavonoïques. Les essais sont effectués selon les protocoles décrits par Dohou et al. [13] et Senhadji et al. [47] ; ils sont réalisés soit sur les extraits (polyphénols, flavonoïdes, tanins et saponosides), soit sur les infusés à 10 % (coumarines, flavanes, flavanols, anthocyanes et proanthocyanidols), soit sur les lyophilisats (substances stéroliques et alcaloïdes). La recherche des groupes chimiques a été déterminée par des réactions en tubes à essai.

Tests antimicrobiens

Tests de sensibilité : technique de diffusion en milieu solide

La solubilisation des lyophilisats obtenus est faite dans le diméthylformamide (DMF) pur. Des essais témoins sont effectués in vitro pour le DMF pur vis-à-vis de chaque type de souche microbienne. Pour cela, nous n'avons enregistré aucune inhibition de la croissance pour l'ensemble des souches bactériennes et fongiques.

Pour la préparation des différentes concentrations d'extraits flavonoïques, 1 mg de chaque extrait lyophilisé (EBr, EHx, ECh, EAc et EAq) est introduit dans un tube à essai auquel 10 ml de DMF pur sont ajoutés. Les tubes sont agités au vortex jusqu'à dissolution totale de l'extrait. Pour les cinq extraits, une solution mère à 100 µg/ml a été préparée. Les solutions mères sont diluées progressivement dans le DMF pur afin d'avoir, pour chaque extrait, une gamme de solutions ayant des concentrations de 20, 40, 60 et 80 µg/ml. Ces quatre solutions plus les solutions mères sont utilisées pour la détermination de leurs activités antibactériennes et antifongiques.

Le test de la sensibilité des bactéries et des champignons est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé, encore appelée méthode des disques [9,11]. Dans des boîtes de Petri stériles, 20 ml de gélose (MH) sont coulés et laissés pendant 20 minutes pour se solidifier. Sur ce milieu de