



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle. Bourahla Nour El Houda

Mlle. Chaa Asma

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie fondamentale

THÈME

**Effet des extraits de *Marrubium vulgare* sur la croissance de
Pseudomonas aeruginosa responsable des infections
nosocomiales**

Soutenue publiquement le 09 /07/2019

DEVANT LE JURY

Présidente :	Mme. Kouadri Boudjelthia Nacima	MAA	U. de Mostaganem
Examinatrice :	Mme. Ait Chabane Ouiza	MCB	U. de Mostaganem
Encadreur :	Mr. Bahri Fouad	Professeur	U. de Mostaganem

Thème réalisé au laboratoire de microbiologie N° 01 et biochimie N° 03

Année universitaire

2018/2019

Remerciements

Au terme de cette étude, nous remercions avant tout, Dieu tout puissant ALLAH qui nous a guidés sur le chemin de la science et nous a permis la réalisation de ce présent travail, il nous a inspiré les bons pas et les justes réflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aura pas abouti.

C'est avec beaucoup de reconnaissance que nous adressons nos sincères remerciements à l'égard de notre promoteur **Mr BAHRI Fouad** professeur à l'université de Mostaganem qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger notre étude, qui a fait preuve d'une grande patience.

Nos profonds remerciements vont aussi Mme **KOUADRI BOUDJELTHIA Nacima** d'avoir accepté de présider le jury, d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de critiquer et de juger ce travail.

Nous sommes particulièrement reconnaissants et honorés par la participation de **Mme AIT CHABANE Ouiza** au jury de ce mémoire. et pour ses remarques judicieuses et son optique enrichissante qui vont valoriser notre recherche

Sans oublier de remercier **Mr SOUANE Abdelkader, Mr ABAIDI Ahmed et SATAL Amel** de nous avoir aidés durant ce travail

Nous remercions également tous nos enseignants(es) du département de biologie de Mostaganem et spécialement ceux de notre spécialité Microbiologie Fondamentale qui ont contribué à notre formation.

Que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail, trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude et reconnaissance.

Dédicace

Aux êtres les plus chers : Mes parents

A mon père

Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils. J'espère que cette thèse sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle soit l'accomplissement de tous tes efforts.

A ma mère

Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanent et son soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie et son aide si précieuse qui a rendu possible la soutenance de ce mémoire.

Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous MES CHERS PARENTS que je le dois, que Dieu vous garde.

A mon cher frère : Mansour toute mon affection et ma tendresse.

A ma belle sœur Nesrine

A mes princesses Feriel et Mariya

A mes oncles Belahoul et Said

A MES TanteSNacera , SadiaAmina , Snoussia , et Fatiha

A mes cousines et cousins : Imen, Khadija , Asma, Nesma , Soria, Ilham, Aya , Meriem, Douaa, Chourouk et Khadija

A mes ami(e)s : Asma , Nesrine, Habibo, Asma , Hafsa, Imen , Marwa et Khadija

A ma grande familleet collègues.

NOUR EL HOUDA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*A mes chers parents **Ma mère** et **mon père** pour leurs sacrifices et leurs soutiens
tout au long de mes études*

A ceux qui m'ont toujours encouragé pour que je réussisse dans mes études

A ma chère binôme, BourahlaNour El Houda

Pour sa patience infinie et sa sympathie

*Ainsi qu'à mes chères sœurs : **Hawaa** et **Khadija***

*A mes chers frères : **AbdElilaah**, et **Mohamed Sadek***

*A ma nièce : **HadjerBelkiss***

*A mon petit ange : **Yasser Amar***

*A tous mes oncles et à toute famille : **CHAA**, et **Ben Chenni***

A tous mes amis de la promotion de master microbiologie fondamentale

Asma

Résumé

Le bassin méditerranéen est connu pour sa richesse naturelle, c'est une source potentielle de nouveaux médicaments d'origine végétale . *Marrubium vulgare* L. ou marrube blanc est une espèce très répandue dans la flore d'Algérie qui est utilisée largement grâce à ses vertus thérapeutiques.

De ce fait, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de l'activité antibactérienne des extraits (méthanolique et acétonique) de l'espèce sélectionner sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les feuilles du *Marrubium vulgare* collecté à Mostaganem (Sayada), ont révélé un taux d'humidité de 61.4 % , l'extraction de ces derniers par macération a donné un rendement de 8.15 % et 2.6 % , respectivement pour l'extrait méthanoïque et acétonique .

Le screening phytochimique de cette espèce a montré que les feuilles de *Marrubium vulgare* étaient riches en différents métabolites secondaires tels que flavonoïdes, tanins, saponosides, anthocyanes, stérols et triterpènes, et le mucilage .

Les résultats obtenus d'après l'étude de l'activité antimicrobienne par diffusion des disques en milieu gélosé des extraits méthanolique et acétonique, sur la souche de référence testée , ont révélé que les zones d'inhibition diminuent avec la diminution de la concentration des extraits. La zone d'inhibition la plus large est enregistrée pour l'extrait de méthanol (10 mm), la méthode de micro-dilution en milieu liquide a illustré des CMI à des valeurs allant de 3.25 mg/ml à 1.625 mg/ml, respectivement pour l'extrait méthanoïque et acétonique, tandis que la valeur de CMB est supérieure aux concentrations testées (> 50 mg/ml) .

Mots clés : *Marrubium vulgare*, *Pseudomonas aeruginosa* , extraits méthanolique et acétonique, l'activité antimicrobienne.

ملخص

يعتبر حوض البحر الأبيض المتوسط منبعاً مهماً لأدوية جديدة ذات طبيعة نباتية، المريوة *Marrubium vulgare L. ou marrube blanc* هي من الفصائل الأكثر توزعاً ضمن الغطاء النباتي للجزائر والمستعملة لأغراض علاجية فعالة.

في هذا الإطار، نحن مهتمون في هذا العمل بدراسة النشاط المضاد للمكروبات لمستخلصات الفصيلة المختارة (الميثانولي والاسيتوني) على نمو *Pseudomonas aeruginosa*.

أظهرت الأوراق المقتطفة من ولاية مستغانم (صيادة) نسبة رطوبة % 61، استخلاص هذه الأخيرة بالترقيد أعطى مردود % 2.6 et % 8.15 علي التوالي من أجل المستخلص الميثانولي والاسيتوني. في حين أن الفحص الكيميائي النباتي كشف أن أوراق المريوة *Marrubium vulgare L* غنية بمختلف الايضيات الثانوية مثل الفلافونويد، التانن، الانتراكينون، السترول والتريتربان و الموسيلاج.

النتائج المتحصل عليها من خلال دراسة النشاط المضاد للمكروبات بانتشار الأقراص في وسط صلب للمستخلص الميثانولي والاسيتوني على الفصيلة المرجعية *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* أظهرت أن المنطقة المثبطة تتناقص مع تناقص التركيز، حيث أنه لوحظ أن المنطقة المثبطة الأكثر توسعاً سجلت من أجل المستخلص الميثانولي. سمحت طريقة التخفيف الجزئي في وسط سائل بالتحصل على التركيز المثبط الأدنى CMI بقيم تتراوح من 3.25مغ/مل إلى 1.625مغ/مل على التوالي من أجل المستخلص الميثانولي والاسيتوني في حين أن قيمة CMB المسجلة هي أكبر من التراكيز المستعملة (< 50مغ/مل).

الكلمات المفتاحية :

Marrubium vulgare المريوة، *Pseudomonas aeruginosa* للمستخلص الميثانولي والاسيتوني، النشاط المضاد للمكروبات.

Abstract

The Mediterranean basin is known for its natural wealth, it is a potential source of new medicines of plant origin. *Marrubium vulgare* L. or white chestnut is a species very widespread in the Algerian flora and which is widely used due to its therapeutic properties.

Consequently, we are interested in this work to study the antibacterial activity of the extracts of the species select on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*.

The leaves of the *Marrubium vulgare* collected from Mostaganem (Sayada), revealed a moisture content of 61.4%, extraction of these latter by maceration gave a yield of 8.15% and 2.6%, respectively for methanolic and acetonic extract. Phytochemical screening of this species showed that *Marrubium vulgare* leaves were rich in various secondary metabolites such as flavonoids, tannins, saponosides, anthocyanins, sterols and triterpenes, and mucilage

The results obtained from the study of antimicrobial activity by diffusion of the discs into the agar medium of the methanolic and acetonic extracts, on the reference strain tested, revealed that the inhibition zones decrease with the decrease in the concentration of the extracts. The widest inhibition zone is recorded for methanol extract (10 mm), the liquid micro-dilution method used to obtain MICs at values ranging from 3.25 mg/ml to 1.625 mg/ml for methanolic and acétonic extract, respectively, while the BMC value is higher than the concentration tested (> 50 mg/ml)

Keywords: *Marrubium vulgare*, *Pseudomonas aeruginosa* , methanolic and acetonic extracts, antimicrobial activity.

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC :	American Type Culture Collection
APG :	Angiosperms Phylogeny group.
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
COOH :	Acide carboxylique
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CMB :	Concentration Minimale Bctéricide
DMSO :	Diméthyl Sulfoxyde
HNO₂ :	Acide nitreux
ILC :	Infections Liées au Cathéter
IN :	Infection Nosocomiale
LDL :	Lipoprotéines de basse Densité
Mpb :	Million pères de bases
MH :	Mueller Hinton
BMH :	Bouillon Mueller Hinton
OMS :	Organisation Mondiale
PAM :	Plantes Médicinales et Aromatiques
VAP :	Pneumonie Associe à Ventilation
R :	Rendement

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation de la structure de base des composés phénoliques..	07
Figure 2 : Structure de base des acides phénoliques.	08
Figure 3 : Structure de base des coumarines.	10
Figure 4: Structures générales des tanins condensés (A) et des tanins hydrolysables (B)....	11
Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes.....	13
Figure 6 : Structure de différentes classes de flavonoïdes	13
Figure 7: Molécule isoprène.....	15
Figure 8: Effet biologiques des polyphénols.....	16
Figure 9: La distribution des Lamiacées dans l'Algérie	18
Figure 10: <i>Marrubium vulgare</i>	19
Figure 11: <i>Marrubium vulgare L</i> période de végétation et de floraison	19
Figure 12: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , vue au microscope électronique à balayage	26
Figure 13: Mode d'action des antibiotiques.....	30
Figure 14: Antibiogramme de la souche sauvage de référence PAO1.....	31
Figure 15: <i>Marrubium vulgare L</i> prise à partir du site d'étude.....	33
Figure 16: Situation géographique de station de collecte de la plante étudiée.	34
Figure 17: Protocole d'extraction des composés phénoliques de <i>Marrubium vulgare.L</i>	40
Figure 18: détermination de la concentration minimale bactéricide CMB.	45
Figure 19: Taux d'humidité de l'espèce <i>Marrubium vulgare</i>	47
Figure 20: Rendement d'extraction des composés phénoliques de la plante étudiée.	48
Figure 21: Mise en évidence des tanins et caractérisation du tanin catéchique.	50
Figure 22: Présence des saponosides	51
Figure 23: Mise en évidence des flavonoïdes (hétérosides flavonoïque), les stérols et triterpènes.	51

Figure 24: Observation microscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> après coloration de Gram (G×1000).	52
Figure 25: A : Aspect macroscopique des colonies du <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur milieu ordinaire	53
Figure 26: Résultats positifs pour la recherche de catalase.	53
Figure 27: Sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 aux antibiotiques testés.	55
Figure 28: Résultats de l'activité antibactérienne des extraits phénoliques de <i>Marrubium vulgare</i> avec différentes concentrations.	56
Figure 29: A, B résultats d'activité antibactérienne des extraits (méthanolique et acétonique), C : contrôle positif et négatif	57
Figure 30: La CMB de l'extrait acétonique et méhanolique (A,B) des feuilles de <i>Marrubium vulgare</i> , C : La boîte A	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principaux acides hydroxy-benzoïque.	08
Tableau 2: Principaux acides hydroxy-cinnamiques	09
Tableau 3: Principales activités biologiques des composés phénoliques	17
Tableau 4: Classification botanique de <i>Marrubium vulgare L.</i>	20
Tableau 5: Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	28
Tableau 6: Données géographiques de la récolte de l'espèce étudiée.	33
Tableau 7: Les antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme.	43
Tableau 08 : Caractères organoleptiques des extraits.	47
Tableau 9: Résultats des tests phytochimiques de <i>Marrubium vulgare.</i>	49
Tableau 10: Résultats de l'activité antimicrobienne des antibiotiques exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.	54
Tableau 11: Diamètres des zones d'inhibition des extraits de la plante étudié.	56
Tableau 12: Valeur des paramètres antimicrobiens des extraits de <i>Marrubium vulgare</i>	59

TABLE DES MATIÈRES

Remerciement

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des Abréviations

Introduction 1

Partie 1 : Etude bibliographique

Chapitre I: Plantes Médicinales et Aromatique

I.Généralités 3

I.1. Définition des plantes médicinales et aromatiques (PAM)..... 3

I.2. Culture des plantes médicinales..... 3

I.2.1 Récolte 4

I.2.2. Séchage 4

I.2.3. Conservation 4

I.3. Mode d'utilisation des plantes médicinales 5

I.3.1. Décoction 5

I.3.2. Infusion 5

I.3.3. Macération 5

I.4. Métabolisme des plantes médicinales 6

I.4.1. Métabolites secondaires 6

I. Composées phénoliques..... 7

I.1. Acide phénolique 8

I.2. Coumarines 9

I.3.Tanins	10
I.3.1.Classification.....	10
I.3.2.Caractérisation.....	11
I.4.Hétérosides.....	12
I.5.Flavonoïdes.....	12
I.5.1.Structure.....	12
I.5.2.Localisation et distribution.....	13
I.5.2.La voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	14
2.Alcaloïdes.....	14
2.1.Structure des alcaloïdes.....	14
2.2.Propriétés des Alcaloïdes.....	15
3.Terpénoïdes.....	15
4.Propriétés biologiques des composées phynoliques.....	15

Chapitre II : Aperçus bibliographique de l'espèce végétale étudiée

I. Généralités	18
I.1. Description botanique	18
I.2. Autres dénominations	19
I.3. Position systématique.....	20
I.4. Répartition géographique.....	20
I.5. Composition chimique de <i>Marrubium Vulgare L.</i>	20
I.6. Pharmacologie.....	21
I.7. Formes d'utilisations et posologies.....	22
I.8. Contre-indications et effets indésirables	22

Chapitre III: Infections nosocomiales

I. Activité antibactérienne	23
I.1. Infections nosocomiales.....	23
I.2. Les facteurs de risque infectieux.....	24
I.3.Microbiologie d'infections nosocomiales bactériennes.....	24

I.4.Agent pathogène cible.....	25
I.4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
I.4.1.1Historique.....	25
I.4.1.2.Description.....	25
I.4.1.3.Production des pigments.....	26
I.4.1.4.Pouvoir pathogène.....	27
I.4.1.5.Génome.....	27
I.4.1.6Classification.....	28
I.5. Les diverses infections nosocomiales liées à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
I.5.1. En réanimation et unités de soins intensifs	28
I.5.2. Dans les centres de brûlés	30
I.6. La résistance bactérienne aux antibiotiques.....	31
I.6.1. Antibiothérapie et résistance chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
I.6.2.Resistance Naturelle.....	31
I.6.3. Resistance acquise.....	31
I.6.3. La multirésistance chez <i>P. aeruginosa</i>	32

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre I: Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal	33
I.1.1. Site de prélèvement.....	33
I.1.2. Détermination de taux d'humidité	34
I.1.3. Préparation et conservation du matériel végétal	35
I.2. Criblage phytochimique.....	35
I.2.1. Alcaloïdes	35
I.2.2. Polyphénol :	35
I.3. Recherche des dérivés anthracéniques	37
I.4.Saponosides.....	38
I.5. Stérols et triterpènes.....	39

I.6. Coumarines	39
I.7. Autres caractérisations	39
I.7.1. Composés réducteurs	39
I.7.2. Mucilages	39
I.8. Préparation des extraits	40
I.8.1. Rendement d'extraction	41
I.9. Évaluation de l'activité antimicrobienne	41
I.9.1. Activation et conservation de la souche.....	41
I.9.2. Tests de confirmation (identification phénotypique).....	42
I.10. AntibioGramme	42
I.11. Activité antibactérienne	43
I.11.1. Les extraits testés	43
I.11.2. Préparation de l'inoculum.....	43
I.11.3. Mode opératoire	43
I.12. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	44
I.12.1. Préparation des gammes de concentration	44
I.12.2. Préparation de l'inoculum.....	45
I.12.3. Inoculation	45
I.13. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	45
I.14. Préparation de la boîte	46

Chapitre II: Résultats et discussion

I. Matériel végétal	47
I.1. Taux d'humidité.....	47
I.2. Caractères organoleptiques des extraits	47
I.2.1. Rendement d'extraction	48
I.3. Screening phytochimique.....	49
I.4. Etude de l'activité antimicrobienne	52
I.4.1. Identification phénotypique	52

I.5. Antibiogramme	54
I.6. Etude de l'activité antimicrobienne des extraits	55
I.6.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé.....	55
I.7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)	58
Conclusion.....	Erreur ! Signet non défini.
Références bibliographique	
Annexe	

Introduction

Introduction

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base Nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et a évolué avec l'histoire de l'humanité (**Djahra, et al., 2013**).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**), près des 80 % de la population dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (**O.M.S, 2002**). Des avantages économiques considérables dans le développement de cette médecine et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés (**Muthu et al., 2006**).

L'Algérie, pays connu par ces ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15 % endémiques et qui appartiennent à plusieurs familles botaniques (**Kahlouche-Riachi, 2013**). Ces plantes sont le réservoir de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires, qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique, elles possèdent d'éventuelles activités biologiques et sont utilisées en médecine traditionnelle pour prévenir et guérir les maladies infectieuses (**Boudjelal, 2013**).

Depuis leur apparition, les antibiotiques sont restés le moyen privilégié de lutte contre les infections bactériennes. Cependant, suite à l'utilisation anarchique, inadéquate et abusive de ces derniers en santé humaine et vétérinaire, on assiste aujourd'hui à l'émergence de bactéries multirésistantes (**Toty et al., 2013**). *Pseudomonas aeruginosa* est l'une de ces bactéries et parmi les principaux agents pathogènes opportunistes impliqués dans de graves infections nosocomiales. C'est aussi un microorganisme polyvalent capable de tolérer des conditions défavorables (**Lattab, 2018**).

Sa résistance intrinsèque élevée et sa capacité à acquérir de nouveaux mécanismes de résistance suite à l'exposition aux antibiotiques pendant les traitements, ont engendré des infections causées par *P. aeruginosa* difficiles à traiter. Actuellement, l'essor de la résistance microbienne aux ces antibiotiques a conduit les chercheurs à mener des investigations aux fins de puiser dans le règne végétal des remèdes naturels (**Breidenstein et al., 2011**).

L'usage des extraits de plante contenant des constituants bio-actifs est devenu une approche très importante dans la médecine préventive, recommandée d'ailleurs par l'OMS.

Les composés phénoliques issus des végétaux génèrent actuellement beaucoup d'intérêt en raison de leur activité antibactérienne prononcée vis-à-vis des souches sensibles et résistantes aux antibiotiques. En plus de leur action directe sur les bactéries, les polyphénols sont capables d'inhiber les systèmes de résistances aux antibiotiques (**Hamadache, 2011**).

De ce fait, le travail présenté dans ce manuscrit est consacré essentiellement à l'étude de l'activité antibactérienne des extraits d'une plante médicinale : *Marrubium vulgare. L.*, une plante appartenant à la famille des lamiacées, qui est largement utilisée dans le bassin méditerranéen pour ces nombreuses vertus thérapeutiques sur la croissance du *pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Le manuscrit est scindé en trois parties essentielles :

- Synthèse bibliographique ;
- La méthodologie appliquée a pour l'objectif :
 - Extraction et détermination des différents composants chimiques présentent dans les feuilles de *Marrubium vulgare* ;
 - Évaluation de l'activité antibactérienne de la plante sélectionnée.
 - L'interprétation et la discussion des résultats obtenus, ainsi que les perspectives de recherche à approfondir dans le cadre du présent projet.

Etude
Bibliographique

Chapitre I

Plantes Médicinales et Aromatiques

I. Généralités

Les végétaux peuplaient la planète bien avant l'homme et ont d'abord servi à le nourrir via la cueillette puis la culture. Leur emploi a rapidement évolué en constatant leurs propriétés thérapeutiques pour traiter les blessures et les maladies. Les plantes aromatiques appartiennent à la fois au domaine des plantes médicinales et des matières premières industrielles d'origine végétale (**Lardry et Haberkorn, 2007**).

Leur histoire est souvent liée à celle de l'humanité. Déjà, depuis l'Égypte antique (environ quatre mille cinq cents ans avant Jésus Christ), l'homme utilise largement les huiles balsamiques, les onguents parfumés, les résines aromatiques, les épices et les végétaux odoriférants en rites, en magie, en thérapeutique, en alimentation ainsi que dans les pratiques de la vie courante, (**Obame-Ongougo, 2009**). Les dernières décennies, la plante médicinale effectue un retour en force, l'OMS a estimé en 2007 qu'environ 80 % de la population des pays en voie de développement ont recourt à la médecine traditionnelle pour leur besoin de santé primaire (**Elmaskaui et al., 2008 ; Tahri et al., 2012 ; Malviya1 et al., 2012**).

De nos jours plus de 35000 espèces des plantes sont utilisés en médecine traditionnelle et en médecine moderne. En effet 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale (**Fettah et al., 2018**).

I.1 Définition des plantes médicinales et aromatiques (PAM)

Chaque pays définit de différentes manières les plantes médicinales, simples ainsi que les produits qui en sont tirés.

Les plantes médicinales et aromatiques, sont à l'origine produits à forte valeur ajoutée (H.E., extraits, résines...) (**Chabrier, 2012**). Selon la pharmacopée française une plante médicinale est définie comme "une drogue végétale" la drogue est donc la partie de la plante la plus riche en principe actif. Elle est issue de plantes fraîches ou desséchées, et utilisée à des fins thérapeutique (**Teuscher et al., 2005 ; Chabrier, 2012 ; Sofowora, 2010**).

I.2 Culture des plantes médicinales

L'industrie pharmaceutique consomme pour en isoler les principes actifs une telle quantité de plantes médicinales et aromatiques que leur récolte dans la nature est aujourd'hui chose impensable. De nombreuses espèces doivent donc être cultivées en grandes quantités.

Lorsqu'on envisage une culture à visée médicinales et aromatique il convient de prendre en compte les exigences écologiques de la plante :

- Sol et le climat “nature de sol et le climat convenant à chaque plante (besoin en eau, température et lumière).
- Culture précédente, fertilisation : les doses correctes des macroéléments nutritifs.
- Récolte : détermination de la période optimale, procédé de récolte.
- Soins des travaux hors la période végétative (**Blot et al., 2012**).

I.2.1 Récolte

La récolte des plantes médicinales en pleine nature suppose une connaissance des espèces végétales, leur habitats et de leur biologie, tous les éléments propice pour leurs récolte, certaines plantes médicinales sont rare et de ce fait protégées par la loi.

On doit cueillir que des plantes saines, bien développées est choisi par un temps sec pour éviter tout source d'altération et que la plante ne perd pas la valeur thérapeutique, Le matin est le moment le plus favorable mais on peut toutefois cueillir aussi le soir, avant la fraîcheur (**Maounda, 2010 ; Blot et al., 2012**).

I.2.2 Séchage

Le fait de séparer, couper ou détacher une partie d'un organisme végétal déclenche un certain nombre de transformation biologique dans la partie prélevée, si la plante n'est pas étalée à l'air en fines couche, elle court le risque de s'abîmer. En réalité, sécher une plante n'est rien de plus que la débarrasser progressivement de son humidité, pour assurer une bonne conservation et évité la dégradation de certaines constituant et la prolifération bactériennes. (**Blot et al.,2012**).

Selon **Teucher et al., en 2005** l'idéal serait de faire sécher les plantes à l'ombre par temps chaud, dans un endroit vaste et bien ventilé.

I.2.3 Conservation

Les fleurs, feuilles...etc. se décolorent rapidement à la lumière, d'où une détérioration de leurs aspect. En effet, la luminosité peut accélérer de nombreux processus chimiques, et entrainer une modification ou dégradation des constituants principales de la plante(**Wichtel et Anton, 1999**), alors il est préférable imposer une protection vis-à-vis de la lumière, le matériel végétales doivent être conservés au sec (température et humidité constant) dans l'obscurité, dans des récipients soigneusement fermé (**Beloued, 2001 ; Blot et al., 2012**).

I.3 Mode d'utilisation des plantes médicinales

Les drogues végétales font l'objet avant leur utilisation sous formes médicaments, de divers préparations pour tirer leurs principe actif et assurer l'action de médicament.

I.3.1 Décoction

Il s'agit d'une extraction en eau, avec un certain temps d'ébullition. Les parties végétales correctement fractionnées sont immergées dans de l'eau potable, chauffées et bouillies 15 min environ (**Blot et al., 2012**).

Elle s'applique en général aux racines, écorces, bois, rameaux, fruits... (**Baba Aissa, 1999**), les décoctions ne se conservent pas on doit les préparer au moment de leur utilisation.

I.3.2 Infusion

C'est une extraction dans l'eau, et le procédé le plus curant et plus classique pour l'utilisation des remèdes végétales. On l'applique généralement aux organes délicats de la plante : fleurs, feuilles aromatiques, sommités... Cette forme permet d'assurer une diffusion optimale des substances volatiles : essences, résines, huiles... (**Baba Aissa, 1999**). La plante divisée de manière appropriée, est immergée dans une quantité donnée de l'eau bouillante, On laisse reposer 15 min. Généralement on emploi 10 g de liquide par gramme de substance active (**Blot et al., 2012**).

I.3.3 Macération

Il s'agit d'un procédé d'extraction solide- liquide à température ambiante (de 15 à 20 C°). Cette méthode permet une extraction douce des principes actifs, on utilise de l'eau, de l'alcool ou parfois du vin.

Le temps de macération dépend des propriétés intrinsèques de la drogue ; la macération dans l'eau ne doit se prolonger exagérément pour éviter toute fermentation ou moisissures (**Blot et al., 2012**). L'inconvénient principal de ce mode de préparation est le risque de contamination bactérienne du produit final en l'absence d'ébullition.

En dehors des trois modes classiques de préparation des plantes médicinales en utilise encore les plantes sous forme sirops, poudres,cataplasme...ect (**Teucher et al., 2005**).

I.4 Métabolisme des plantes médicinales

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Les métabolites sont les molécules issues du métabolisme des végétaux ou d'animaux. On distingue deux classes : métabolites primaires et métabolites secondaires (**Hartmann, 2007**).

Les métabolites secondaires produits des métabolites en faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches) (**Hartmann, 2007**).

I.4.1 Métabolites secondaires

- **Définition :**

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques synthétisées par les végétaux à partir de métabolites primaires (acides aminés, hydrates de carbone) par diverses voies (**Amrouche et Yaya, 2017**). On trouve ces métabolites dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à une autre.

Ces composés sont souvent considérés comme n'étant pas essentiels à la vie de la plante (**Levasseur et al., 2013**), mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction, Dont ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures (la protection de l'attaque des pathogènes ou des herbivores, attraction des pollinisateurs) (**Guillon, 2010**), comme ils participent à des réponses allélopathiques.

Ils sont aussi des molécules très utiles pour l'homme, comme colorants, arômes, antibiotiques, herbicides, drogues... etc. (**Merzougui et Tadj, 2015**).

Ils constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés antioxydantes, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes (**Epifano et al., 2007**).

De nos jours, un grand nombre de ces composés sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci le sont selon leur usage traditionnel. Nous citerons ci-dessous quelques importants groupes phytochimiques, source de molécules biologiquement actives (**Madjdoub, 2006**).

Tous les végétaux contiennent des composés phénoliques mais, comme c'est le cas pour la plupart des substances naturelles qualifiées de métabolites secondaires, leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces (**Merzougui et Tadj, 2015**).

Plusieurs milliers de composés phénoliques sont en effet des éléments importants des qualités sensorielles et nutritionnelles des végétaux que consomme l'homme et leur intervention dans la santé est maintenant reconnue dans des domaines variés (**Benhammou, 2011**).

- **Les principaux composés bioactifs des plantes médicinales**

Les métabolites secondaires sont caractéristiques des plantes supérieures. Ils sont répartis en trois grandes familles chez les végétaux, sur la base de leurs voies de biosynthèses : les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes (**Guillon, 2010**).

1. Les Composés phénoliques (Les polyphénols)

Les polyphénols ou Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement répandus chez les plantes et forment une grande classe de produits chimiques aux niveaux des tissus superficiels et sont très importants dans la contribution à la couleur et au goût des fruits et végétaux (**Nait Said, 2007**).

La structure de base qui les caractérise est la présence d'un ou de plusieurs noyaux aromatiques auxquels sont directement liés à un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester). Parmi ces métabolites on cite : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins. Ils sont classés selon la présence des différents substituants sur les noyaux et selon leur degré de saturation (**Ait Chabane, 2018**).

Les formes phénoliques les plus simples (**Figure 01**), présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches (**Guillaume, 2015**).

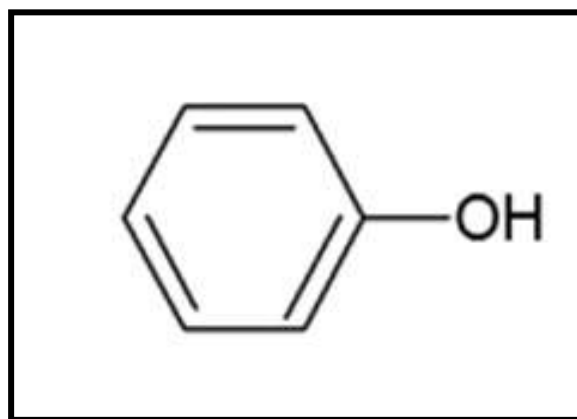


Figure 1: Représentation de la structure de base des composés phénoliques. (**Guillaume, 2015**).

1.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des substances phytochimiques ayant au moins un groupe carboxyle et un groupe hydroxy-phénolique (**Hamadache, 2011**). Ils dérivent principalement de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique. Les acides phénoliques comportent un radical COOH. Ils se trouvent souvent sous la forme de glycosides ou d'esters. Ces phénols sont solubles dans les solvants polaires (**Bendahou et al., 2008**).

Les principaux acides phénoliques sont : les acides benzoïques et les acides cinnamiques (**Figure 02**).

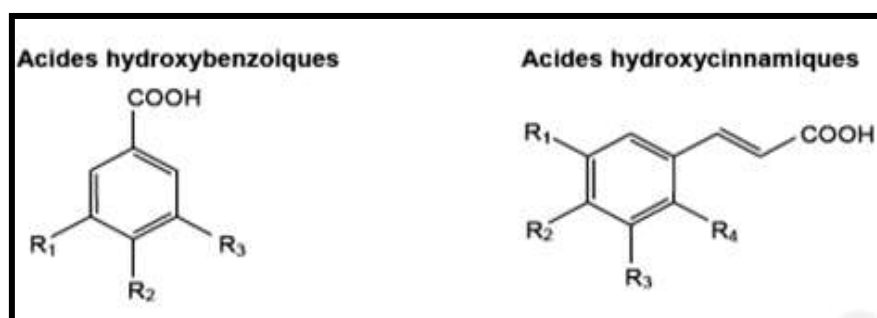


Figure 2 : Structure de base des acides phénoliques. (**Hamadache, 2011**).

1.1.1 Les acides benzoïques

Les acides benzoïques ont une structure générale d'un squelette à sept atomes de Carbone C₆-C₁, les variations de structure de différents acides benzoïques (**Tableau 01**) se situent dans l'hydroxylation et méthylation du noyau aromatique (**Bellebcir, 2008**).

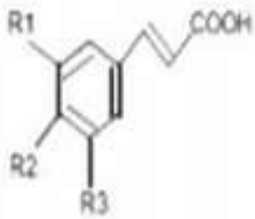
Tableau 1: Principaux acides hydroxy-benzoïque. (**Hassin Boukal, 2015**).

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide varulique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicyclique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

1.1.2 Les acides cinnamiques

Les acides cinnamiques ont une structure générale de C₆-C₃ les plus répandus chez les végétaux sont l'acide coumarique, caféique, férulique, et sinapique (**Tableau 02**). On rencontre au moins un d'entre ces acides, dans pratiquement tous les végétaux supérieurs (**Bellebcir, 2008**).

Tableau 2: Principaux acides hydroxy-cinnamiques (**Hassin Boukal, 2015**).

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux, anti-allergènes, vasodilatateurs et antioxydants (**Boudjelal, 2013**).

1.2. Les coumarines

Les différentes coumarines (coumarines simples et furanocoumarines) dérivent particulièrement des acides Cinnamiques et leur répartition est assez limitée chez les végétaux. (**Ait Chabane, 2018**). De différents types, elles se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Les coumarines (**Figure 03**), sont très répandues dans les racines et les écorces des plantes où plus de 500 composés ont été répertoriés (**Hamadache, 2011**).

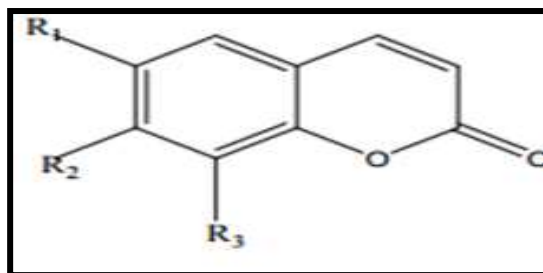


Figure 3 : Structure de base des coumarines (Jandi, 2015).

1.3. Les tanins

On appelle communément « Tanins » des substances d'origine végétale, non azotées, de structure polyphénolique, soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone, peu soluble dans l'éther, capable de se lier aux protéines en solution et de les précipiter (Benbelaid, 2015).

Ces composés regroupent les tanins hydrolysables ou tannoïdes et les tanins condensés vrais non hydrolysables. Les tanins hydrolysables (ou pyrogalliques), résultent d'une estérification des cinq fonctions alcooliques du glucose par divers acides polyphénoliques dont particulièrement l'acide gallique et l'acide élлагique dimère du précédent. Par contre, tanins condensés (flavoniques et/ou catéchiques) constituent une famille de substances polyphénoliques hétérogènes formée de 4 à 6 molécules de flavanes. Les tanins condensés sont rencontrés dans les plantes des gymnospermes et des angiospermes ; alors que les tanins hydrolysables sont présents exclusivement chez les espèces appartenant à la classe des dicotylédones (Ait chabane, 2018).

1.3.1. Classification

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents (Figure 04) par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétiques : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Deramchia, 2018).

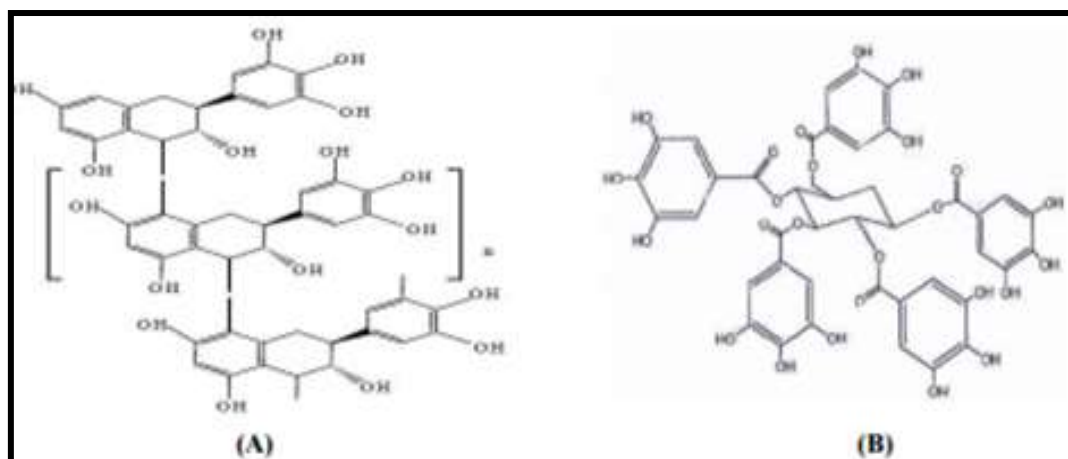


Figure 4: Structures générales des tanins condensés (A) et des tanins hydrolysables (B) (Hamadache, 2011).

a) Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: **les tanins galliques, et les tanins ellagiques (Toure, 2015).**

b) Tanins condensés

Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3 ols, le plus souvent épicatechine et catéchine. Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (kahlouche-Riachi, 2013).

1.3.2. Caractérisation

- a) Avec les sels ferriques, on obtient des précipités colorés différemment selon la nature des tanins :
 - bleu-noir avec les tanins hydrolysables.
 - brun-verdâtre avec les tanins condensés.
- b) Les tanins galliques donnent une coloration rose avec l'iodate de potassium (acide gallique libre est coloré en orange par ce réactif).
- c) Les tanins ellagiques sont colorés en rose par HNO_2 en milieu acétique (rose, la couleur vive au pourpre puis au bleu).
- d) Les tanins condensés sont colorés en rouge par la vanilline chlorhydrique (Guit, 2011).

En solution alcooliques, ils donnent avec le chlorure ferrique, très dilué, une coloration bleue (tanins galliques) ou verte (tanins catéchiques) (**Nait Said, 2007**).

1.4. Les hétérosides

C'est une famille de composés résultant de la condensation d'un ose avec un composé non glucidique appelé la génine ou encore la fabrication aglycone (**Bruneton, 2009**).

On distingue 03 groupes importants d'hétérosides :

a. Saponosides

Ces substances, légèrement caustiques et irritantes, probablement toxique, rendent les plantes qui en contiennent tout à fait incombustible (**Duraffourd, 1997**). Ces molécules ont la propriété de mousser avec l'eau. Plusieurs à saponosides sont utilisées par l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de formes galénique, d'autre ont des applications en phytothérapie (**Duraffourd, 1997**).

b. Cardiotoniques

Les glycosides cardiotoniques constituent un groupe bien individualisé et d'une grande homogénéité tant structurale que pharmacologique. Ces molécules naturelles d'origine végétale demeurent des médicaments intéressants pour le traitement de l'insuffisance cardiaque (**Breuneton, 2009**).

c. Hétérosides anthracénique

Ces composés sont des puissant laxatifs et purgatifs qui provoquent chez les animaux qui les consomment des troubles digestifs plus ou moins importants. Les solanacées contiennent des hétérosides anthracéniques (**Norman et al., 1986**).

1.5. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (**Guillaume, 2015 : Marouf et Reynaud, 2007**).

1.5.1 Structure et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyranne (**Skerget et al., 2005**), Leur structure de base est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6) (**Figure 05**),

constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (**Benhammou, 2011**).

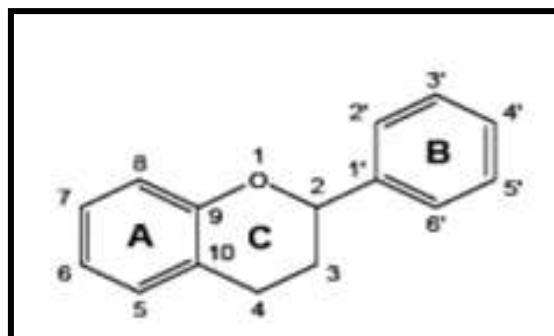


Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes (**Hamadache, 2011**).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont : flavones, isoflavandiols, flavanols, flavandiols, aurones, chalcones, anthocyanins (**Figure 06**), les plus répandus sont les flavones jaunes ou orangées, et les anthocyanes rouges ou bleus qui sont des composés hydrosolubles et pouvant s'accumuler dans les vacuoles cellulaires (**Heller et al., 1998**).

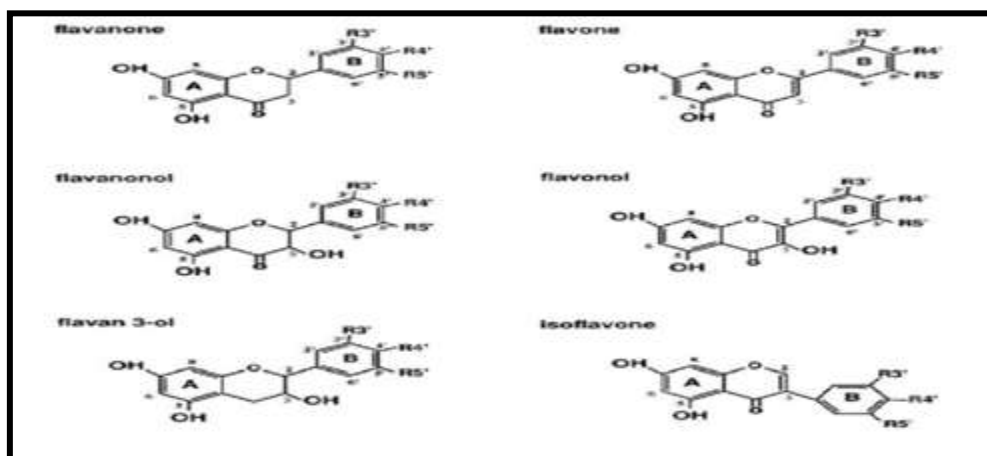


Figure 6 : Structure de différentes classes de flavonoïdes. (**Benbelaid, 2015**).

1.5.2. Localisation et distribution

Les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal, ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes. Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle.

Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques. **(Benbelaid, 2015)**.

1.5.3. La voie de biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes se fait à partir d'un précurseur commun : la 4,2',4' 6'- tétrahydroxychalcone. Cette chalone qui a une couleur jaune, sous l'action d'enzyme. Elle est métabolisée en différentes classes de flavonoïdes. La forme in vivo des flavonoïdes est eu après des étapes ultérieures essentiellement la glycosylation et l'acylation **(Kahlouche Riachi, 2014 ;Laurent, 2003)**.

2. Les alcaloïdes

Ce sont des substances organiques d'origine naturelle, le plus souvent végétales, azotés, de caractère alcalin. Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), et de structure complexe (noyau hétérocyclique), on les trouve dans plusieurs famille des plantes, la plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un gout amer **(Kahlouche-Riachi, 2014)**.

Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine. Ce sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques ou amers et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques. **(Kebili, 2016)**.

2.1. Structure des alcaloïdes

Ils ont des structures très diverses et dérivent de différents acides aminés tels que le tryptophane, l'ornithine, la lysine, l'asparate, l'anthranilate, la phénylalanine et la tyrosine. Ces acides aminés sont décarboxylés en amines et couplées à d'autres squelettes carbonés **(Kabouche, 2005)**, en passant par différentes voies biosynthétiques.

De nombreux poisons dangereux comme l'atropine par exemple, sont extraite de la belladone mortellement toxique et qui peut cependant être utilisée à faible dose dans une optique thérapeutique. Les alcaloïdes sont utilisés comme anti cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) **(Kahlouche- Riachi, 2014)**.

On distingue généralement trois types d'alcaloïdes :

- Les alcaloïdes vrais, qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle.
- Les pseudo-alcaloïdes, qui ne dérivent pas d'acides aminés.

Les proto- alcaloïdes, qui dérivent d'acide aminé mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures **(Kebili, 2016)**.

2.2. Propriétés des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont caractérisés par une solubilité faible dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool et peuvent donner des colorations spécifiques avec certains réactifs (réactifs de Mayer, de Dragendorff, de Wasicky, de Bouchardat). Ils exercent en générale de puissantes actions pharmacologiques (**Laurent, 2003**).

3. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes (ou terpènes) regroupent un ensemble de molécules très différentes tant d'un point de vue structural que fonctionnel (**Legrand, 2015**). Avec plus de 40 000 molécules connus, ils constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organiques végétaux (**Aharoni et al., 2005**). Sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C₅H₈), communément appelée isoprène. Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en : monoterpénoïdes (C₁₀), sesquiterpénoïdes (C₁₅) et diterpénoïdes (C₂₀) (**Bendriss, 2013**).

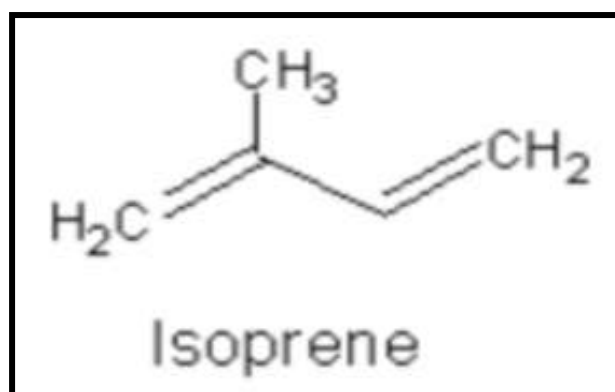


Figure 7: Molécule isoprène. (**Bellebcir, 2008**).

5. Propriétés biologiques des composés phénoliques

- **Effet biologiques des polyphénols**

Les cellules végétales résistent aux infections par la synthèse des composés phénoliques. Différentes études ont montré que les extraits des plantes possèdent des sites

D'action différents de ceux des antibiotiques ce qui suggère qu'ils auront un effet inhibiteur sur les souches bactériennes résistantes (**Hamadache, 2011**).

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-allergènes, (**Figure 08**) vasodilatateurs et antioxydants (**Dehimi, 2011**).

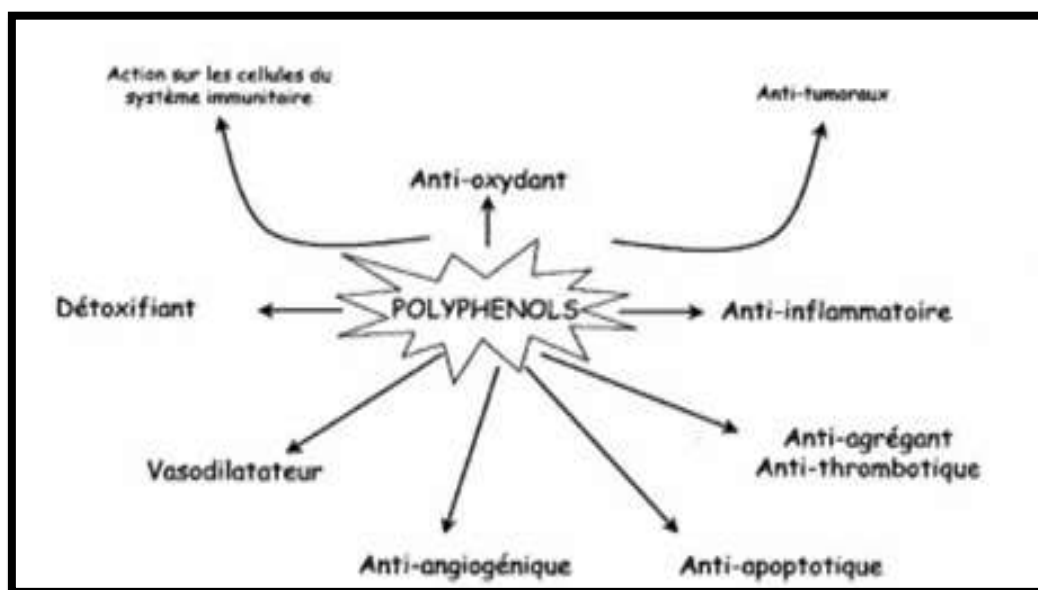


Figure 8: Effet biologiques des polyphénols. (**Dehimi, 2011**).

- **Propriétés antibactériennes des composés phénoliques**

Les travaux scientifiques réalisés sur les extraits de différentes espèces végétales ont attribué l'effet antibactérien de ces derniers principalement aux composés phénoliques (**Tableau 3**). Une corrélation positive est observée entre la teneur en polyphénols totaux des extraits de plusieurs plantes et leur activité antibactérienne (**Bendahou et al., 2008**). En effet, ces molécules présentent une activité bactériostatique ou bactéricide in vitro, sur une large gamme de microorganismes (**Hamadache, 2011**).

Tableau 3: Principales activités biologiques des composés phénoliques. (Hamadache, 2011).

Activités biologiques	
Acides phénoliques	Antioxydante, antibactérienne, anti-virale, anti-inflammatoire, anticancéreuse.
Flavonoïdes	Antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire, antiallergiques, hypotenseurs, anticancéreuse, cardiotonique.
Coumarines	Vasoprotectrice, antioedemateuse, antibactérienne.
Tanins	Antimicrobienne, antiparasitaire, vasodilatateur.

- **Polyphénols inhibiteurs des mécanismes de résistance aux antibiotiques**

L'effet synergique présent entre les antibiotiques et les extraits phénoliques issus des plantes a été observé depuis longue date, mais les mécanismes moléculaires de ces interactions restent encore ambigus. Des études récentes ont démontré que ces extraits naturels sont capables d'inhiber partiellement ou totalement les systèmes de résistance des souches bactériennes aux antibiotiques (Tiwari *et al.*, 2005).

Chapitre II
Aperçus bibliographique
de l'espèce végétale
étudier



Figure 10: *Marrubium vulgare* (Jandi, 2017).

C'est une plante pérenne de couleur grisonnante qui ressemble légèrement à la menthe et qui porte plusieurs feuilles pétiolées (3cm) à bords crénelés ou dentés, elle se perpétue et se multiplie par des bourgeons nés sur la tige souterraine bonnier. Les fleurs sont blanches groupées en amas axillaires serrés apparaissent du mois de mai jusqu'au mois de septembre (Figure 11), et parfois encore en hiver (Bruneton, 2009).



Figure 11: *Marrubium vulgare* L période de végétation et de floraison.
(Khalouche Riachi, 2014).

En Algérie, on retrouve 6 espèces différentes au sein de ce même genre : *Marrubium vulgare*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssoides*, *Marrubium supinum* Pomel et *Marrubium deserti* de Noé (Quezel et Santa, 1963).

I.2 Autres dénominations

- En Algérie, le marrube est connu par le nom Marriouth (Quezel et Santa, 1963).
- Maroc : Merrîwt (Bellakhdar, 1997).
- Tunisie : Marroubia (Boukef, 1986).

- Anglais : Harehound, en Italien : Marrubio. Selon (**Mubashir et Bahar, 2012**).

I.3 Position systématique

Tableau 4: Classification botanique de *Marrubium vulgare L* selon APG III, 2009.

Règne	Végétale
Sous règne	<i>Plantes vasculaires</i>
Embranchement	<i>Spermatophytes</i>
Division	<i>Magnoliophytes</i>
Classe	<i>Magnolipsides</i>
Sous classe	<i>Astérides</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiacées</i>
Genre	<i>Marrubium</i>
Espèce	<i>vulgare</i>

I.4 Répartition géographique

Le Marrube blanc pousse presque dans toute l'Europe surtout dans ses régions méditerranéennes, au centre et au sud-ouest de l'Asie, au nord de l'Afrique et plus précisément en Algérie. Cette espèce est assez commune de l'ensemble du territoire, très présente au nord et quasiment absente au sud (**Abadi et Hassani, 2013 ; Bouterfas et al., 2014**).

Cette espèce est dispersée dans des lieux incultes, décombres, terrains vagues, prairies chaudes et sèches, garrigues, en général sur les sols calcaires (**Schlempher et al., 1996**).

I.5 Composition chimique de *Marrubium Vulgare L*

Selon le plan chimique, le Marrube renferme des diterpènes, des flavonoïdes, des phényléthanoïdes glucosidiques tels que l'acteoside et le forsythoside B, des tanins, des saponosides et mucilages (**Djahra, 2014**).

Les diterpènes sont principalement représentés par des dérivées labdaniques : Le marrubénol et le marrubiine ce dernier est considéré comme un diterpène très actif, le principe amer dû à la présence de lactone (**Bruneton, 2009 ; Kahlouche-Riachi, 2014**). Toutefois, la présence des traces d'huiles essentielles (**Bruneton, 2009**).

Comportant différents composés monoterpéniques “moins de 1% : α -pinène, camphène, limonène”(Wichtl et Anton, 2003 ; Djahra, 2014).

Le Marrube blanc contient, en outre, des minéraux tels que : le potassium et surtout beaucoup de fer, il présente également un certain taux de composés azotés caractéristiques de sa famille, tels que : choline, stachydrine, bétonicine, ..., (Schlempher et al., 1996).

I.6 Pharmacologie

Cette plante est traditionnellement utilisée dans le traitement symptomatique de la toux et au cours des affections bronchiques aiguës et bénignes. Elle est considérée comme expectorant et fluidificatrice des sécrétions bronchiques, en cas de toux productive. Elle donne des résultats satisfaisants dans le cas des bronchites et des inflammations de la gorge (Hseini et Kahouadji, 2007).

En Allemagne, la monographie établie par la commission E du FIDMD (Fédéral Institute for Drugs and Medical Devices) précise que le *marrube* est utilisé en cas de perte de l'appétit et de troubles dyspeptiques, il est également montré qu'un extrait de marrube protège, in vitro, les lipoprotéines (LDL) de la peroxydation par le cuivre (Bruneton, 2009).

La décoction de marrube soulage les gastralgies. Les feuilles de cette plante sont utilisées sous forme de cataplasme sur le front en cas de migraines et fièvre, ainsi contre les otites sur les tempes. Elle est conseillée aussi en cas de diabète, diarrhée, vers intestinaux et pour embellir les cheveux. Une fumigation à un intérêt thérapeutique en cas de fièvre typhoïde. On l'utilise contre la fièvre et sur les abcès et furoncles crever afin de les panser et les cicatrifier (Tahri et al., 2012).

L'espèce de *Marrubium vulgare* aurait une action hypoglycémisante (Roman et al., 1992 ; Mubashir et Bahar, 2012 ; Vergara-Galicia et al., 2012 ; Benkhniqne et al., 2014), l'huile essentielle du marrube est irritante pour la peau et les muqueuses (Ben Gueddeur, 2002).

- **Activité antibactérienne**

L'extrait méthanoïque de la plante possède une activité anti-*Helicobacter pylori* ATCC 43504 significative. Cela est dû au flavonoïde (la quercétine) qui a un effet inhibiteur sur l'uréase de la bactérie (Cushnie et al., 2011).

Une autre étude réalisée par Molina-Salinas et al., en 2011 a révélé que l'extrait méthanoïque, aqueux, l'extrait de l'acétone et de l'hexane de la plante ont un effet inhibiteur efficace contre *Mycobacterium tuberculosis* (agent causatif de la tuberculose) à une

concentration supérieure à 200 µg/ml. Ce potentiel d'activités biologiques est dû à la richesse de *M. vulgare* en principes actifs.

I.7 Formes d'utilisations et posologies

La quantité par jour correspond à 4.5 g de drogue. La durée du traitement est en moyenne de 2 semaines.

- Parties utilisées : feuilles et sommité fleurie
- Mode utilisation : décoction, cataplasme et infusion, les teintures (7.5 ml 3 fois par jour) en cas des traitements par marrubiine (métabolite insoluble dans l'eau) (**Weel et al., 1999 ; Raynaud, 2007**).

I.8 Contre-indications et effets indésirables

On ne dispose d'aucune donnée toxicologique sur cette plante, la présence de diterpène uranique incite à une grande prudence dans son utilisation (**Bruneton, 2009**). Il est généralement recommandé aux femmes enceintes d'éviter le marrube parce qu'elle stimulerait l'utérus et pourrait avoir une action abortive (**Weel et al., 1999**).

Chapitre III

Infections nosocomiales

I. Activité antibactérienne

Dès sa naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux et provoquer une infection.

Pour cette raison, il est connu que le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques, qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effet toxique sur les organismes supérieurs. Néanmoins, la consommation à grande échelle de ces « médicaments » a entraîné la sélection des souches multi résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouveaux substituts: des remèdes à base de plantes médicinales, qui sont riches en métabolites secondaires (les polyphénol, flavonoides, les tanins...) et qui possèdent des activités antimicrobiennes constituant une alternative des systèmes de soins primaires, leur efficacité dépend ainsi de leurs richesses en composées phénoliques; plus elle est riche en substances actives, plus son activité est importante (Ali-Shtayeh *et al.*, 1998).

I.1 Infections nosocomiales

Une infection est par définition, la pénétration dans l'organisme d'un agent étranger (bactérie, virus, champignon, parasite) capable de s'y multiplier et d'y induire des lésions pathologiques (Abdelli, 2017).

Les infections nosocomiales, aussi appelées infections hospitalières, sont définies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme des infections acquises pendant un séjour à l'hôpital et qui n'étaient pas présentes ni acquises en incubation au moment de l'admission du patient, lorsque la situation précise à l'admission n'est pas connue, un délai d'au moins 48 heures après admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour distinguer une infection d'acquisition nosocomiale d'une infection communautaire (OMS, 2002 ; Epelboin et Macey, 2009 ; Ksongo Kapuka *et al.*, 2016).

Les infections nosocomiales sont dues à de très nombreux micro-organismes incluant les bactéries, les champignons (*Candida*, *Aspergillus*) parasites et les virus (hépatite B.). Cependant, les bactéries sont à l'origine de près de 90-100% des infections nosocomiales (Berche *et al.*, 1989).

I.2 Les facteurs de risque infectieux

Les infections nosocomiales ont une grande probabilité de survenue dans un certain nombre de circonstances parfaitement définies.

Au premier rang de ces facteurs de risque infectieux figure l'affaiblissement de défenses immunitaires (immunodépression). Cet affaiblissement peut être dû à des facteurs d'ordres physiologiques, tels que : l'âge (nouveau-né, vieillards), la grossesse ou la malnutrition (**Epelboin et Macey, 2008**).

L'état de la flore microbienne chez les personnes hospitalisées est également un facteur de risque important. Cette flore est souvent profondément altérée chez des patients pour de nombreuses raisons, incluant : malnutrition, diabète et toxicomanie (héroïne, alcool). Toutefois, c'est surtout l'utilisation intensive des antibiotiques à large spectre sur les populations hospitalisées qui est à l'origine de la sélection de bactéries souvent résistantes à de nombreux antibiotiques habituels. Ainsi, les malades acquièrent une nouvelle flore par la sélection d'espèces bactériennes et résistantes à partir de leur flore endogène ou à partir de leurs environnements par l'intermédiaire des soins de l'infirmier qui leur sont prodigués.

L'hospitalisation prolongée et l'acte invasif (chirurgie, endoscopie, sondage vésicale, cathétérisme...etc.) (**Berche et al., 1989 ;Merzougui et al., 2018**).

I.3 Microbiologie d'infections nosocomiales bactériennes

Les bactéries incriminées dans les infections nosocomiales sont non seulement les pathogènes classiques, mais aussi les germes opportunistes possédant à priori un faible potentiel pathogène, qui dans certaines conditions notamment un état fragilisé du patient, induisent à des conséquences cliniques majeures.

Par ordre décroissant de fréquence, les germes responsables des infections nosocomiales selon **Epelboin et Macey, 2008** sont :

1. *Escherichia coli* : 20 %
2. *Staphylococcus aureus* : 15 %
3. *Pseudomonas aeruginosa* : 10 %
4. *Entérocoques*
5. *Proteus mirabilis*

60 % des bactéries sont des bacilles à Gram négatif, 30 % sont des cocci à Gram positif. Ces germes ont la particularité d'être multi résistants aux antibiotiques suite à la pression exercée par l'antibiothérapie largement dispensée dans établissement de santé (**Epelboin et Macey, 2008**).

I.4 Agent pathogène cible

I.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa occupe une position centrale dans la problématique actuelle des infections nosocomiales (IN). Ce bacille à Gram négatif ubiquitaire est responsable de 10 % à 15 % de l'ensemble des infections nosocomiales. Il constitue l'espèce type la plus importante du genre *Pseudomonas*, et représente à lui seul 90% des bactéries de ce groupe isolées en clinique humaine (Mesaros *et al.*, 2007 ; Barbier et Wolff, 2010 ; Mérens *et al.*, 2013 ; Pokra *et al.*, 2016), une fréquence supérieure étant rapportée chez certaines catégories de patients à haut risque : pathologies broncho-pulmonaires chroniques (notamment la mucoviscidose), immunodépression (neutropénie, syndrome d'immunodéficience acquise), grands brûlés, patients hospitalisés en réanimation (Richards *et al.*, 1999 ; Emerson *et al.*, 2010 ; Barbier et Wolff, 2010).

I.4.1.1 Historique

Cette bactérie a été découverte pour la première fois en 1872 par le chercheur allemand Schroeter sous l'appellation *Bacterium aeruginosum*, après une observation d'un aspect bleuté du pus en présence de la bactérie. Cette coloration est à l'origine de son nom, aerugo signifiant vert-de-gris en latin. Le pharmacien militaire Charles Gessard avait suivi ses recherches sur les bacilles pathogènes, tel que quelques-uns avaient été isolés, mais un bon nombre d'entre eux gardaient encore leur secret pour la coloration azurée que revêtaient certaines plaies purulentes intriguait particulièrement GESSARD, il en chercha la cause. De milieu de culture en milieu de culture, GESSARD réussit à isoler le coupable, responsable de l'infection en 1882 (Pitt, 1998).

I.4.1.2 Description

C'est une bactérie à coloration de Gram négative. Elle se présente sous forme de bacilles fins (Figure 12), droits ou légèrement courbés non sporulant et très mobiles grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire, dépourvu de capsule, présent notamment dans le sol et dans les milieux aquatiques. Il mesure de 1 à 5 μm de long et de 0,5 à 1 μm de large (Lattab, 2018).



Figure 12: *Pseudomonas aeruginosa*, vue au microscope électronique à balayage (Elyajouri, 2012).

Le bacille pyocyanique c'est une bactérie hautement versatile dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique, il peut utiliser les sucres simples et complexes d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone. Par conséquent, elle peut être isolée en culture sur des milieux ordinaires ou sur des milieux rendus sélectifs par addition d'inhibiteur, tel que le cétrimide. Cependant, la survie de la bactérie est observée dans des conditions anaérobies, expliquée par sa capacité à métaboliser l'arginine (Vander *et al.*, 1984) et le pyruvate (Eschbach *et al.*, 2004) ou par utilisation des nitrates comme accepteur final d'électrons (Filiatrault *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* est capable de se développer dans un spectre de températures compris entre 4 et 42°C ; sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C.

I.4.1.3 Production des pigments

Selon Delarasse (2007), le bacille pyocyanique produit deux types de pigments (fluorescent ou non) qui servent à son identification. Ils peuvent être mis en évidence dans le milieu de King B et King A.

- Pyoverdine : pigment jaune-vert fluorescent, soluble dans l'eau, insoluble dans le chloroforme. La pyoverdine peut entrer en compétition avec la transferrine de l'hôte afin de chélater le fer et d'en assurer le transport à l'intérieur des bactéries. Ce mécanisme permet à la bactérie de disposer d'une concentration en fer suffisante pour assurer sa prolifération.

- Pyocyanine (phénazinique) : pigment bleu-vert non fluorescent soluble dans l'eau et le chloroforme. Cette espèce est la seule à le produire. Elle a une activité cytostatique mise en évidence in vitro sur des cultures de lymphocytes. Elle a une action néfaste sur les cellules endothéliales (You Essoh, 2013).

I.4.1.4 Pouvoir pathogène :

Il est principalement lié à ses nombreux facteurs de virulence qui sont impliqués dans les différentes étapes du processus infectieux. Ces facteurs permettent l'adhérence de la bactérie, sa multiplication, la formation de biofilms, son échappement au système immunitaire de l'hôte et sa persistance dans un environnement hostile (Nyalidome, 2016).

P.aeruginosa est un pathogène opportuniste, pour l'organisme, puisqu'il va profiter de la diminution des défenses de l'organisme pour se développer. Il peut coloniser de nombreux tissus, notamment le tissu cutané, osseux et des dispositifs médicaux, tels les valves cardiaques. Il est aussi responsable d'infections ophtalmiques, du tractus urinaire et des poumons.

P.aeruginosa est l'agent pathogène prédominant associé à une morbidité et mortalité élevée chez les patients souffrant de mucoviscidose (You Essoh, 2013).

I.4.1.5 Le Génome de *Pseudomonas aeruginosa*

Selon Stover *et al.*, en 2000, le génome de *Pseudomonas aeruginosa* est le plus grand génome bactérien séquencé connu à ce jour (souche de référence PAO1) par rapport à d'autres bactéries comme *Escherichia coli* (4,6 Mpb) ou encore *Staphylococcus aureus* (2,6 Mpb). Le chromosome bactérien comprend 6,3 millions de paires de bases, codant pour 5570 gènes. Le génome chromosomique code notamment pour la plupart des facteurs de pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa*. De nombreux gènes sont impliqués dans des systèmes de régulation et des fonctions métaboliques expliquant le caractère ubiquitaire de cette bactérie et sa capacité à se développer dans des systèmes pauvres en nutriments.

I.4.1.6 Classification

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. Sa taxonomie est présentée dans le (Tableau 05).

Tableau 5: Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* (Singleton, 2004).

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>aeruginosa</i>

I.5 Les diverses infections nosocomiales liées à *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa se place parmi les agents étiologiques majeurs dans les infections nosocomiales. L'incidence des infections nosocomiales à *Pseudomonasaeruginosa* est variable en fonction du site de l'infection, allant de 5,7 % pour les infections sur cathéters, à 15,3 % pour les infections pulmonaires (Elyajouri, 2012).

I.5.1 En réanimation et unités de soins intensifs

Les patients, souvent immunodéprimés, sont habituellement intubés, ventilés, sondés et porteurs de cathéters périphériques et centraux, de ce fait le risque de contamination et d'infection à *Pseudomonas aeruginosa* est majeur (Mesaros *et al.*, 2007).

I.5.1.1 Les infections urinaires nosocomiales (IUN)

Ce sont les infections nosocomiales les plus fréquentes (40% des cas d'IN). Le sondage urinaire est responsable dans 80 % des cas des infections urinaires nosocomiales. Le risque augmente avec la durée (5 à 10 % par jour de sondage). Leur fréquence est en rapport avec le non-respect des mesures d'asepsie et d'hygiène (Epelboin et Macey, 2008).

Elles sont également liées (dans 20 % des cas) à des gestes sur des voies urinaires tels que l'endoscopie (cystoscopie) et la chirurgie urologique(Tasseau et Baron, 1989 ; Epelboin et Macey, 2008).

L'IUN est due à un germe endogène dans 2/3 cas, le germe prédominant reste *E.coli*, mais d'autres espèces sont plus en plus fréquentes *Entérocoques*, *Pseudomonas sp*, *Klebsiella sp*, *Entérobacters sp*, *Serratia sp*, *Candida sp*.

(Epelboin et Macey,2008).

P. aeruginosa est le deuxième microorganisme en cause après *E. coli*. Il a été démontré que cette bactérie était associée à des infections du tractus urinaire compliquées, dans certaines prostatites. Dans la plupart des cas de cette infection, la formation de biofilm liée à l'instrumentation du système urinaire (la sonde), ainsi que l'antibiothérapie préalable constitue les principales causes. Il est à noter que la prévalence de la résistance aux antibiotiques est augmentée chez les personnes ayant des infections urinaires à répétitions (**Haond et al., 1996**).

I.5.1.2 Pneumopathies nosocomiales

Les pneumopathies nosocomiales, acquises en milieu hospitalier, se distinguant des pneumopathies communautaires, acquises en dehors de l'hôpital ou survenant dans des 48 premières heures d'hospitalisation. Il s'agit de la 2^{ème} cause d'infection nosocomiale, les pneumopathies nosocomiales sont au premier rang des IN en termes de mortalité (**Epelboin et Macey, 2008**).

Les principaux germes responsables sont *S.aureus*, *P.aeruginosa*les bacilles à gram négatif autre que les pyocyaniques. Ils sont en rapport avec la ventilation (type et durée) et le patient lui-même. *P.aeruginosa* est responsable d'environ 20 % des bronchopneumopathies chez les patients ventilés (VAP) et la mortalité liée aux VAP à *P.aeruginosa* est plus importante (60 à 70 %) que celle liée aux autres espèces bactériennes (20 à 50%) atteignent parfois de la mucoviscidose (**Dayane Otero et al., 2006 ; Grare, 2016**).

I.5.1.3 Infections liées au cathéter

Les (ILC) sont obligatoirement nosocomiale, représentant la quatrième cause des infections acquises en réanimation. Les infections liées au cathéter représentent 1/3 des bactériémies nosocomiales, parmi les germes fréquemment retrouvés de *P.aeruginosa*, quel que soit le mécanisme de la colonisation (externe, interne ou par voie hématogène), le bacille pyocyanique vient coloniser le manchon fibrineux qui tapisse la portion intravasculaire du cathéter, aussi bien sur sa face endoluminale qu'à sa face externe (**Epelboin, Macey, 2008 ; Elyajouri, 2012**).

I.5.2 Dans les centres de brûlés

I.5.2.1 Infections cutanées et des plaies

L'altération de la barrière physique qui constitue la peau, ainsi que la diminution locale de la réponse immune humorale entraînent une colonisation rapide de la peau par *P.aeruginosa*, dans ce cas elle est responsable de 34,2 % des infections. (**Elyajouri, 2012**).

I.6 La résistance bactérienne aux antibiotiques

Pourquoi y a-t-il des bactéries qui ne sont pas affectées par certains antibiotiques. Dans certains cas, une bactérie résiste parce qu'elle est dépourvue de la structure qui constitue la cible de l'antibiotique. La résistance peut aussi être due au fait que la cellule empêche l'antibiotique d'atteindre sa cible (**Figure 13**). Chez beaucoup de bactéries Gram-négative, la membrane externe est imperméable à certain antibiotique, et chez les bactéries Gram-positives aussi bien que Gram-négatives, la membrane cytoplasmique peut constituer une barrière. (**Singleton, 2004**).

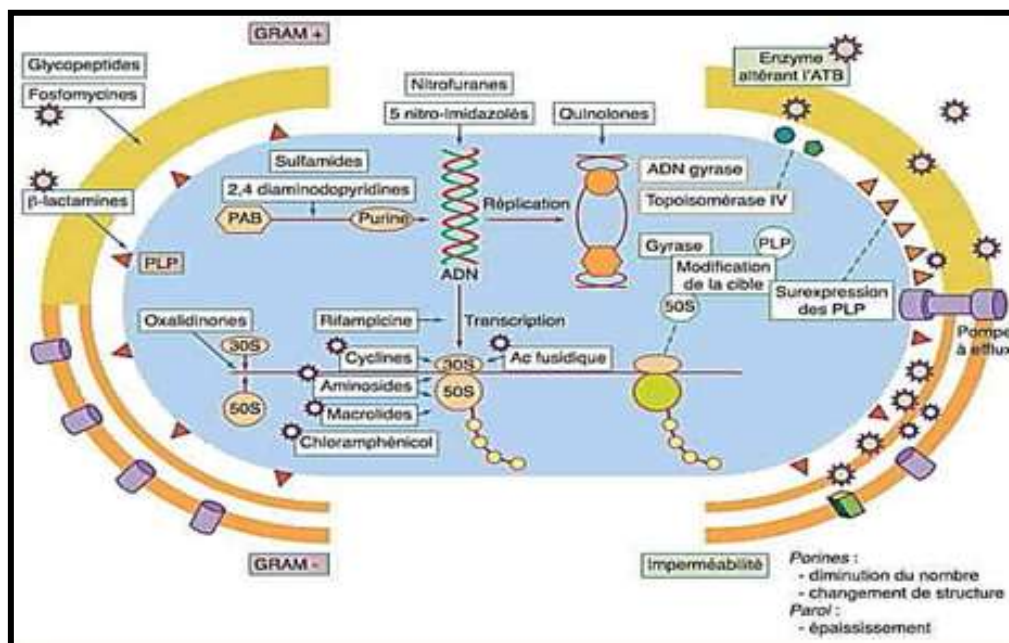


Figure 13: Mode d'action des antibiotiques (**Nyaledome Ablavi, 2016**).

I.6.1 Antibiothérapie et résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*

Le nombre d'antibiotiques actifs contre le *P.aeruginosa* est limité. Ce dernier possède une résistance naturelle à un certain nombre d'antibiotiques. La résistance naturelle est une caractéristique de l'espèce bactérienne, elle délimite le spectre naturel de l'antibiotique et constitue une aide à l'identification (**Nyaledome Ablavi, 2016**).

Les molécules habituellement actives sur cette bactérie sont représentées par une certaine β - lactamines (pipéraciline et ticarcilone avec ou sans inhibiteur, ceflazidime, céfépime, aztréonam, imipénème, méropénème, doripénème), les fluoroquinolones, les (ciprofloxacine, lévofloxacine) aminosides (sauf la kanamycine), la fosfomycine et la colimycine (**Grare, 2016**).

I.6.2 Résistance naturelle

P.aeruginosa présente un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques, en raison de la production de la β -lactamase chromosomique inductible de classe C à large spectre, dénommée Ampc et mauvaise perméabilité de la membrane externe.(10 à 100 fois moins que chez *E. coli*), la production constitutive d'un système d'efflux actif Mexab-OprM. Cette bactérie est donc naturellement résistant aux pénicillines des groupes V G M et A, à la plupart des céphalosporines de troisième génération,*Pseudomonas aeruginosa* est aussi résistant à la kanamycine (**Jeannot et Plisiat, 2016**).



Figure 14: Antibiogramme de la souche sauvage de référence PAO1 (**Grare, 2016**).

I.6.3 Résistance acquise :

En dehors de sa résistance naturelle, le bacille pyocyanique peut utiliser tout un ensemble de mécanismes pour échapper à l'action des antibiotiques auxquels il est habituellement sensible (**Grare, 2016**). Certains mécanismes qualifiés d'intrinsèques (propres à l'espèce). Il est capable de développer toute une variété de mécanismes de résistance à ces antibiotiques par : la sécrétion de pénicillinases, de céphalosporinases, des mutations, l'imperméabilité, la modification des porines.

Par ailleurs, l'apparition de nouveaux gènes résistances chez *Pseudomonas aeruginosa* est fréquemment liée à l'acquisition de matériel génétique étranger (plasmide, transposon et intégrons)(**Philips et al., 2006 ; Grare, 2016**).

I.6.4 La multirésistance chez *P. aeruginosa*

En l'absence d'une définition standardisée, la multirésistance chez *P. aeruginosa* est habituellement décrite comme la résistance ou la diminution de la sensibilité à au moins trois classes d'antibiotiques actifs sur les souches sauvages (**Figure 14**), β -lactamines hors carbapénèmes (pénicillines, céphalosporines et monobactames), carbapénèmes, aminosides et fluoroquinolones (**Obritsch *et al.*, 2004; Shorr, 2009**).

Partie
Expérimentale

Chapitre I

Matériel et Méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1 Matériel végétal

La plante médicinale utilisée dans cette étude appartenant à la famille des Lamiacées, *Marrubium vulgare L.* Elle a été collectée dans la région de Sayada de la wilaya de Mostaganem.

On a choisi pour notre étude les feuilles puisque c'est à leurs niveau que se trouve la majorité des composés bioactifs (lieu de synthèse) (**Figure 15**).



Figure 15: *Marrubium vulgare L* prise à partir du site d'étude.

I.1.1 Site de prélèvement

Les échantillons de la plante ont été récoltés à Mostaganem (**Tableau 06**) en février 2019.

Tableau 6: Données géographiques de la récolte de l'espèce étudiée.

Espèce	Région	Coordonnées géographiques
<i>Marrubium vulgare L</i>	Sayada (Mostaganem)	Latitude : 35.9513, Longitude : 0.13072 35°57'5 Nord, 0°7'51 Est Altitude : 136 m (www.google.fr).

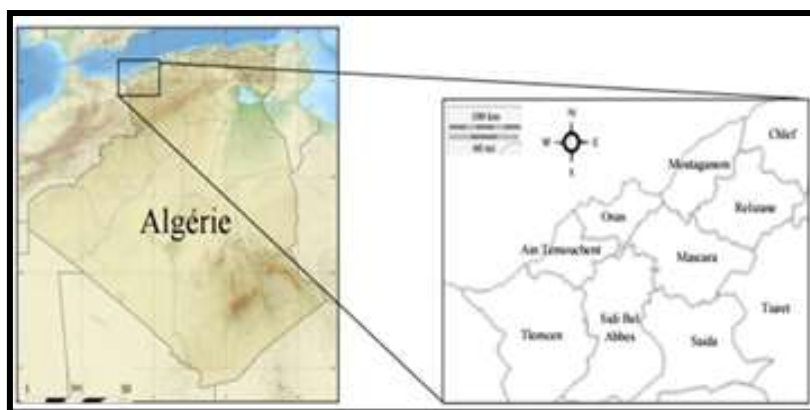


Figure 16: Situation géographique de station de collecte de la plante étudiée.

I.1.2 Détermination de taux d'humidité

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans la matière végétale. Il est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivant :

$$H (\%) = (M1-M2)/M1 \times 100$$

Avec :

- H : taux d'humidité exprimé en pourcentage (%).
- M1 : poids de l'échantillon en gramme après la récolte (matière fraîche).
- M2 : poids de l'échantillon en gramme après le séchage (matière sèche) (**Bouterfas et al.,2013**).

I.1.3 Préparation et conservation du matériel végétal

Les plantes sont prélevées tôt le matin, elles sont placées dans des sacs en tissu puis transportés en vue de séchage et d'analyse.

Après la récolte, le matériel végétal est soumis à un rinçage à l'eau de robinet pour éliminer les impuretés, puis étendu en couche mince, dans une chambre foncée aérée à l'abri de la lumière et l'humidité, pour éviter la photo-oxydation des molécules bioactives, pendant 20 jours (**Djahra et al., 2012**). Après séchage, les feuilles sont réduites en poudre assez fine à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre ainsi obtenue est conservée dans des bocaux hermétiquement fermés en vue d'une utilisation ultérieure.

I.2 Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique ayant pour le but la mise en évidence des différents métabolites secondaires présente dans une plante donnée. Ils sont basés en partie sur l'analyse qualitative, le principe est basé sur la formation des précipitations et des complexes colorés. L'analyse photochimique a été réalisée sur les feuilles de *Marrubium vulgare L* selon les méthodes standardisées de **Bruneton (1999)**, **Sofowora (1993)** et **Trease et Evans (2002)**.

I.2.1 Alcaloïdes**• Préparation de la solution à analyser**

50 ml d'une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10% sont ajoutés à 10g de la poudre végétale, après une macération de 24H à température ambiante, le macéré est filtré et lavé avec l'eau distillée de manière d'obtenir 50 ml de filtrat.

- 1 ml de filtrat est introduit dans un tube à essai auquel 5 gouttes de réactif Mayer (**Annexe 3**) sont ajoutées.
- 1 ml de filtrat est introduit dans un tube à essai auquel 5 gouttes de réactif Wagner (**Annexe 3**) sont ajoutées.

La formation d'un précipité blanc jaunâtre pour le premier tube et brune pour le deuxième indique la présence des alcaloïdes.

I.2.2 Polyphénol :**• Préparation de la solution à analyser**

Nous avons réalisé une infusion à partir 5g de la poudre végétale, la drogue est introduite dans un erlenmeyer contenant 100 ml de l'eau distillée bouillante après 15 min

d'infusion, elle est filtrée et rincée à l'eau chaude de manière à obtenir 100 ml d'infusés à 5%.

I.2.2.1 Caractérisation

a) Tanins

- **Réaction de coloration**

À 5 ml d'infusés à 5%, nous avons ajouté 1 ml d'une solution aqueuse diluée de chlorure de fer (III) (FeCl_3) à 1% est ajouté. L'apparition d'une couleur verdâtre ou bleu noirâtre indique la présence de tanin.

- **Différenciation des tanins (réaction de Stiasny)**

La réaction de Stiasny permet la différenciation des tanins catéchiques et des tanins galliques. Pour cela, à 30 ml d'infusés à 5%, 15 ml de réactif Stiasny (**Annexe 3**) sont ajoutés, le mélange est chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 min.

L'obtention d'un précipité montre la présence de tanins catéchiques, le mélange est filtré et saturé avec 5 g d'acétate de sodium (CH_3COONa), ensuite, nous avons ajouté 1 ml de chlorure de fer (III) (FeCl_3) à 1%, le développement d'une couleur bleue noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif Stiasny.

b) Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments incolores ou colorés. Ce sont des composés polyphénoliques largement répandus dans le règne végétal, plusieurs tests de caractérisation permettent la différenciation entre les types de Flavonoïdes.

- **Anthocyanes**

À 5 ml d'infusés à 5 % (couleur foncée), 5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10% et 5 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) dilué au demi sont ajoutés. La coloration s'accroît par acidification puis vire en milieu basique au bleu violacé en présence des anthocyanes.

- **Réaction à la cyanidine**

5 ml d'infusés sont introduits dans un tube à essai auquel 5 ml d'alcool chlorhydrique (éthanol à 95°, eau distillée, HCl concentré à partie égale en volume de 5 ml) et 1 ml d'alcool isoamylique, puis quelques copeaux de magnésium sont ajoutés.

L'apparition au niveau de la couche surnageante d'alcool isoamylique une coloration :

- Rose orangée caractérise les flavones
- Rose violacée indique la présence des flavonones
- Rouge conclut à la présence de flavonols et de flavononols

- Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques
- La réaction est négative avec les chalcones, dihydrochalcones, les aurones, les cathéchines et les isoflavones.

- **Leucoanthocyanes**

Dans le criblage des leuco anthocyanes, la réaction à la cyanidine est effectuée sans ajouter de magnésium et chauffer pendant 15 minutes au bain-marie. La réaction positive se caractérise par une teinte rouge cerise ou violacée.

I.3 Recherche des dérivés anthracéniques

Solution à analyser

- **Extrait chloroformique**

Un volume de 10 ml de chloroforme est ajouté à 1 g de la poudre végétale, après chauffage au bain-marie pendant 3 min le mélange est filtré à chaude et complété à 10 ml si nécessaire.

- **Hydrolysats**

Sur une partie de résidu épuisée par le chloroforme, 10 ml d'eau distillée et 1 ml de HCl concentrée sont ajoutés, le mélange est chauffé au bain-marie bouillant pendant 15 min, puis refroidi sous courant d'eau et filtré.

Caractérisation

- **Anthracénique libre réaction de(Borntäger)**

1 ml de l'extrait chloroformique est introduit dans un tube à essai puis 1 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) dilué à 50% est ajouté.

Après agitation du mélange, l'apparition d'une couleur plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

- **Dérivés anthracéniques combinés**

- **O-Hétérosides**

5 ml d'hydrolysats ont été agités avec 5 ml de chloroforme, la phase organique est soutirée et introduite dans un tube puis 1 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) dilué à 50% est ajouté, le mélange est agité, la phase aqueuse est conservée. La présence d'O-Hétérosides se traduit par une coloration plus ou moins intense. En cas d'une réaction négative ou faiblement positive le screening est continu pour les O-Hétérosides à génine réduite.

- **O-Hétérosides à génine réduite**

À 5 ml d'hydrolysats, 3 à 4 gouttes de (FeCl₃) à 10 % est ajoutées le tout est chauffé au bain-marie pendant 4 minutes, après chauffage et refroidissement le mélange est agité avec 5 ml de chloroforme, la phase chloroformique est soutirée avec 1 ml (NH₄OH) dilué en demi. La coloration rouge est plus intense que précédemment en présence des produits d'oxydation anthranols ou anthrones.

- **C-Hétérosides**

La phase aqueuse qui a été conservée et reprise par 10 ml d'eau distillée, puis 1 ml (FeCl₃) à 10 % est ajouté et chauffé au bain-marie pendant 30 minutes, le mélange est agité avec 5 ml de chloroforme. La phase chloroformique est introduite dans un tube à essai puis nous ajoutons 1 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) dilué. Après agitation, l'apparition d'une couleur rouge indique la présence des C-Hétérosides.

I.4 Saponosides

Préparation de la solution à analyser

La présence des saponosides est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse. Pour cette caractérisation, un décocté à 1 % a été préparé en introduisant 1 g de la drogue dans un erlenmeyer contenant 100 ml distillés bouillants, après 15 minutes d'ébullition, le mélange est filtré après refroidissement et complété à 100 ml .

Caractérisation

Dans une série de 10 tubes à essai, des volumes de 1 à 10 ml de décocté à 1 % y sont introduits successivement (1ml dans le tube n°1, 2 ml dans le tube n°2...), le volume final dans chaque tube étant de nouveau réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée, puis agité dans le sens de la longueur pendant 15 secondes, après un repos de 15 minutes en position verticale. La hauteur de la mousse dans chaque tube est mesurée, le tube dans lequel la hauteur est de 1 cm permet de calculer l'indice de mousse.

$$Idm = 1000/N$$

- Idm : Indice de mousse
- N : Numéros du tube dans la hauteur de tube est 1 cm.

Si la hauteur est supérieure à 1 cm, Idm est supérieur à 100, par contre si la hauteur est inférieure à 1 cm Idm est inférieur à 100.

I.5 Stérols et triterpènes**Solution à analyser**

Elle est obtenue par macération 24 H d'un gramme de la poudre végétale dans 20 ml d'éther diéthylique, suivie d'une filtration et le filtrat complété à 20 ml avec d'éther diéthylique.

Caractérisation

10 ml de la solution à analyser est évaporé à sec, le résidu a été repris avec 1 ml d'anhydride acétique ($C_4H_6O_3$) puis 1 ml de chloroforme ($CHCl_3$), la solution obtenue est partagée en deux capsules, dans le premier tube 1 à 2 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés, l'autre suivra le témoin, à l'aide d'une pipette au fond de tube de la zone de contact des deux liquides, la formation d'un cercle rouge brunâtre ou violet et la couche sur-nageante devenant verte ou violette indique la présence de stérols et triterpènes.

I.6 Coumarines

Nous avons évaporé à sec 5 ml de l'extrait d'éther diéthyl, le résidu est repris avec 2 ml d'eau chaude et ensuite partagée en deux tubes ensuite 0.5 ml de NH_4OH à 25% est ajouté dans l'un des tubes, le mélange est observé sous rayonnement ultraviolet à 366 nm.

La présence des coumarines est révélée par l'apparition d'une fluorescence intense bleu verdâtre ou violet dans le tube qui contient de l'ammoniaque.

I.7 Autres caractérisations**Solution à analyser**

10 g de la poudre végétale est introduit dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml d'eau distillée, le mélange est porté à ébullition pendant 15 min, afin de préparer un décocté à 10 %.

I.7.1 Composés réducteurs

5 ml de décocté à 10 % est évaporé à sec au bain-marie. Le résidu est repris avec 1 ml de réactif de Fehling (0,5 ml de réactif A+0,5 ml de réactif B). Les composés réducteurs révélés par la formation de précipités rouge brique.

I.7.2 Mucilages

1 ml de décocté à 10 % et 5 ml d'éthanol absolu sont introduits dans un tube à essai, révèle les mucilages par l'obtention de précipités floconneux.

I.8 Préparation des extraits

Dans cette étude, nous avons utilisé une méthode d'extraction solide –liquide. Le protocole d'extraction des composés phénoliques est celui décrit par **Diallo *et al.*, (2004)** et **Falleh *et al.*, (2008)** avec quelques modifications (**Figure 17**), et consiste de macérer 20 g de la drogue végétale (poudre végétale sèche) dans 200 ml de solvant pur pendant 24 h sous agitation à température ambiante et à l'obscurité (la fiole de macération est enveloppée par du papier Aluminium), pour cette extraction nous avons utilisé deux solvants polaires (méthanol et acétone). Après les macéras ont été filtrés (papiers filtre) et concentrés sous vide au Rota vapeur R120 sous pression réduite à 48°C et 41°C, respectivement pour l'extrait méthanoïque et acétonique. Les résidus secs obtenus ont été récupérés et conservés à 4°C.

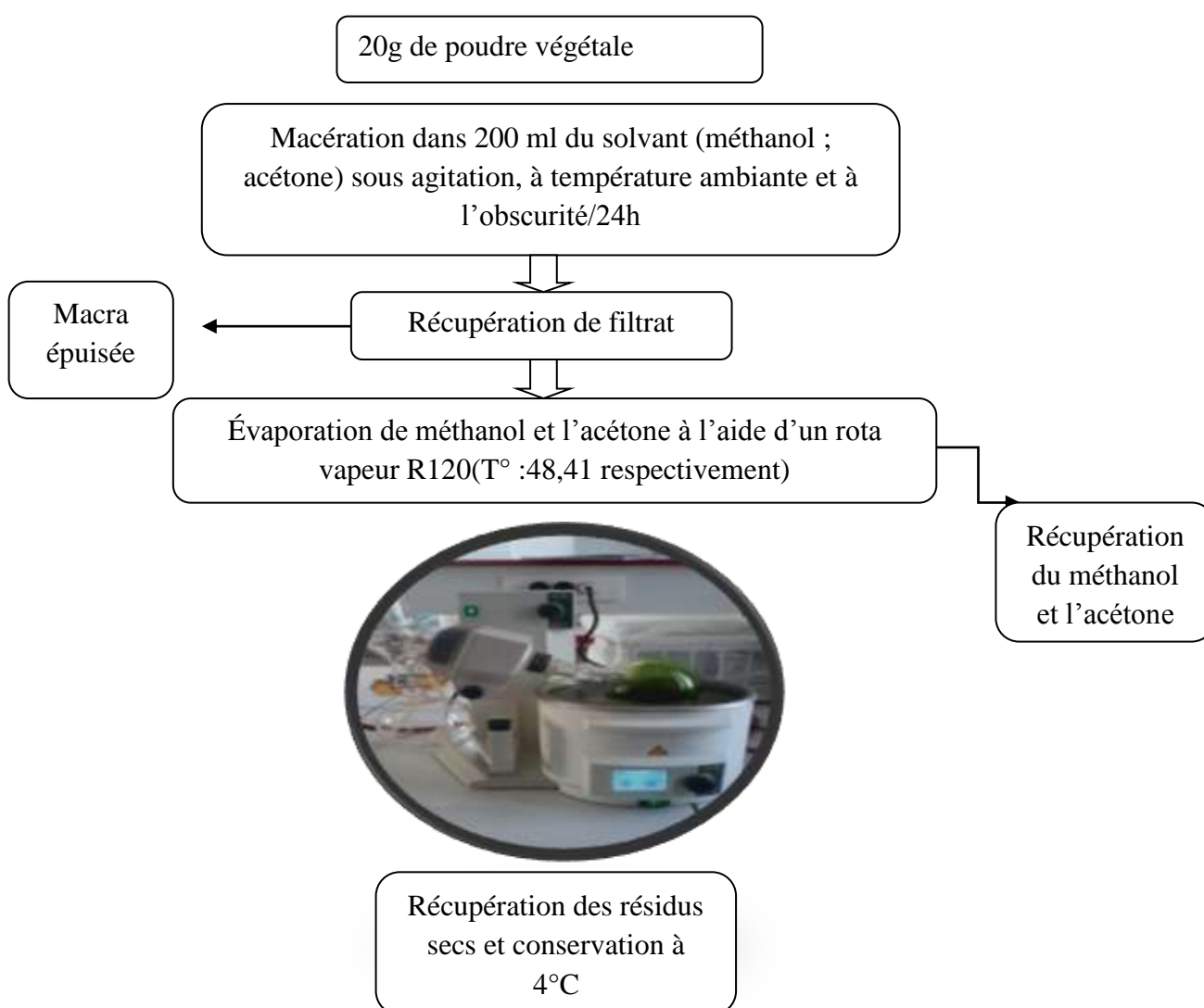


Figure 17: Protocole d'extraction des composés phénoliques de *Marrubium vulgare*.L (Diallo *et al.*, 2004 ; Falleh *et al.*, 2008).

I.8.1 Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport entre le poids d'extraction et le poids de la plante sèche à traiter, il est exprimé en pourcentage suivant la formule donnée par (Falleh *et al.*, 2008).

$$R (\%) = 100 \text{ Mext/Méch.}$$

Où : R est le rendement en %.

Mext est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en gramme.

Méch est la masse sèche de l'échantillon végétal en gramme.

I.9 Évaluation de l'activité antimicrobienne

- **Souche bactérienne**

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits de *Marrubium vulgare L.*, nous avons testé la sensibilité d'une souche microbienne de référence (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), provenant de l'institut de pasteur d'Algérie, il s'agit d'une bactérie à gram négatif occupe une position importante dans la problématique des infections nosocomiales.

- **Milieux de culture**

-Gélose nutritive (GN) : milieu d'isolement et de conservation non sélectif des souches

-Gélose Mueller Hinton (MH) : milieu utilisé pour l'étude de la sensibilité des bactéries, vis-à-vis de l'antibiotique et des extraits.

-Bouillon Mueller Hinton (BMH) : milieu utilisé pour l'étude de la concentration minimale inhibitrice

- Bouillon nutritif : pour l'enrichissement de la souche

-Gélose King A : milieu utilisé pour le test confirmatif de la souche mettre en évidence la production des pyocyanine par *Pseudomonas aeruginosa*. (Annexe 3)

I.9.1 Activation et conservation de la souche

La souche est enrichie en bouillon nutritif pendant 18 h à 37°C°, puis elle est entretenue par repiquage sur GN incliné, après l'incuber pendant 24 h à 37°C°, elle est conservée à 4 C° (Tournous, 2016).

I.9.2 Tests de confirmation (identification phénotypique)

I.9.2.1 Examen microscopique

L'examen microscopique peut se faire soit à l'état frais soit après une coloration.

- **L'état frais**

C'est une technique (**Annexe 2**) qui permet l'observation des bactéries vivantes entre la lame et lamelle à l'objectif 40. Le but est d'apprécier la forme, le mode de groupement et la mobilité bactérienne. (**Tournous, 2016**).

- **L'examen microscopique après coloration de Gram**

Cette méthode permet de distinguer en utilisant les propriétés de la paroi bactérienne (**Annexe 2**), elle permet aussi d'apprécier la forme de la bactérie (**Tournous, 2016**).

I.9.2.2 Examen macroscopique

Après une étape de culture en étuve, on observe la forme, les contours, l'odeur, l'aspect des colonies couleur et/ou la pigmentation. L'odeur de seringat et la présence des pigments (pyocyanine) dans le milieu King A, sont caractéristiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa*. (**Tournous, 2016**).

- **Recherche de catalase**

Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu gélose à l'aide d'une pipette pasteur boutonné en contact avec l'eau oxygénée à 10 V, cette activité est réalisée selon la méthode décrite par (**Prescott et al., 2003**).

I.10 Antibiogramme

a) Préparation de l'inoculum

10 antibiotiques (**Tableau 7**) ont été testés par la méthode de diffusion des disques en milieu Gélosé MuellerHinton (**NCCLS, 1997**) sur la croissance de *P.aeruginosa*. À l'aide d'une anse de platine stérile, on prélève une colonie bien isolée à partir d'une culture de 18 h à 24 h sur gélose nutritive, nous déchargeons l'anse dans 5 ml d'eau physiologique stérile (0.9% de NaCl) la suspension est ajustée à 10^8 UFC/ml équivalent (0.5 McFarland).

b) Mode opératoire

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum. Il est réalisé par le trempage de l'écouvillon dans la suspension bactérienne (presser sur la paroi interne pour décharger au maximum) l'ensemencement est réalisé par le frottement de l'écouvillon sur la totalité de la surface de la boîte Pétrie (60°) contenant 20 ml de gélose Mueller Hinton (MH). Les disques d'antibiotiques ont été déposés stérilement sur la surface inoculée.

Les boîtes ont été fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 1 h. Elles ont été par la suite portées à l'incubation à 37°C pendant 24 h. La lecture des résultats est faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition après une durée d'incubation de 24h à 37°C (CA-SFM, 2018 ; CA-SFM, 2013).

Tableau 7: Les antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme.

Antibiotique	Abréviation	Charge de disque (µg)
Amikacine	AK	30
Amoxilline	AML	30
Piperaciline	PRL	30
Tobramycine	TOB	10
Norfloxacin	NOR	10
Cephalothin	KF	30
Gentamicine	CN	30
Nalidixic acid	NA	30
Cefazoline	KZ	30
Néomycine	N	30

I.11 Activité antibactérienne

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits de *Marrubium vulgare L* préparés, on a utilisé la méthode de diffusion par disque en milieu gélosé Mueller Hinton (MH) (Choi et al., 2006).

I.11.1 Les extraits testés

500 mg de chaque extrait (méthanoïque et acétonique) sont dissous dans 10 ml DMSO/eau, afin de préparer une solution mère 50 mg/ml. Une dilution en séries de cette solution mère selon une progression semi-logarithmique de raison 2 permet d'obtenir diverses concentrations filles (réalisation d'une gamme de concentration (1/2, 1/4, 1/8, 1/16)). (Choi et al., 2006).

I.11.2 Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture de 18 h sur gélose nutritive (GN), une suspension bactérienne a été préparée avec de l'eau physiologique (0.9% de NaCl) puis ajustée à 10⁸ UFC/ml équivalent

(0.5 McFarland) par spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625nm. La densité optique obtenue doit être comprise entre (0.08 et 0.1) (**Radojevic et al., 2013 ; Bouhaddouda et al., 2016**).

I.11.3 Mode opératoire

Les boîtes Pétries contenant la gélose MH ont étéensemencés par écouvillonnage de l'inoculum 10^6 UFC/ml, des disques stériles de papier Wathman ayant un diamètre de 6 mm ont été imprégnés avec 10µl de chaque solution puis déposés aseptiquement sur la gélose ensemencée.

Le contrôle négatif est représenté par des disques contenant la même quantité (10µl) de DMSO, le disque d'antibiotique Norfoxacine auquel la souche est sensible a été utilisé comme contrôle positif, ce dernier a été déterminé après réalisation antibiogramme standard pour la souche testée.

Les boîtes ont été incubées à 37 C° pendant 24h. L'activité antibactérienne des extraits phénoliques a été évalué par mesure des diamètres d'inhibition formée autour des disques. Selon **Ponce et al., en 2003**, la souche est résistante à la substance lorsque le diamètre mesuré est inférieur à 8 mm, sensible lorsqu'il est compris entre 9 et 14 mm, très sensible lorsqu'il est compris entre 15 et 19 mm et extrêmement sensibles lorsqu'il est supérieur à 20 mm. Toutes les manipulations refaites trois fois dans des conditions stériles.

I.12 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de façon générale a la plus faible concentration de la substance prouve inhiber toute croissance visible à l'œil nu après 18 à 24 h de culture à 37 C°. Elle est réalisable par le contact direct en milieu gélosé ou milieu liquide (**Lattab, 2018**).

Pour déterminer les CMI des extraits de la plante étudiée, nous avons utilisé la technique de microdilution en milieu liquide dans des microplaques à 96 puits.

I.12.1 Préparation des gammes de concentration

Une solution initiale (50mg/ml) de chaque extrait (méthanol et l'acétone) a été préparée. À partir de cette solution mère, une série de dilution selon une progression géométrique $\frac{1}{2}$ a été effectuée afin d'obtenir 11 dilutions de 50 à 0.096 mg/ml préparé dans le DMSO ce dernier n'a été testé sur la souche cible et n'a présenté aucune activité antibactérienne (**Konan, 2015**).

I.12.2 Préparation de l'inoculum

la souche bactérienne à tester a été cultivée dans la gélose nutritive, après 18 h incubation à 37 C°, une colonie a été prélevée puis homogénéisée avec 10 ml de bouillon Muller Hinton (BMH) et incubé 3 h à 37C° pour avoir une préculture la suspension est ajustée à 10⁸ UFC/ml (**Ouattara et al., 2016**).

I.12.3 Inoculation

Dans la première colonne d'une microplaque de 8×12 puits, les extraits végétaux (20µl) sont introduits dans 10 premiers puits numérotés de la plus élevée à la plus faible concentration (50 mg/ml-0.096 mg/ml). Ensuite 80 µl de bouillon Muller Hinton (BMH) a été ajouté, puis les puits sont inoculés avec 100 µl de l'inoculum bactérien, 100µl de BMH additionnés à 100 µl de l'inoculum ont servi le témoin de croissance (Tc) de plus 200 µl de BMH mise dans un autre puits en servi témoin de contrôle de stérilité (Ts) le volume final dans chaque puits est de 200µl (**Ionut et al., 2015**).

I.13 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme la plus faible concentration en extrait testé capable de tuer plus de 99.9% de l'inoculum bactérien pour sa détermination, le contenu des puits dans lesquels aucun trouble n'a observé, a été prélevée à l'aide d'une anse calibrée (2µl), puis déposée en strie parallèle de 5 cm sur gélose de Muller-Hinton en commençant par le tube correspondant à la CMI (**Figure 18**), la boîte pétrie est en suite incubé à 37 C° pendant 24 h (**Biyiti et al., 2004**).



Figure 18: Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB.

Le nombre de colonies sur les stries de cette boîte a été comparé à celui de la boîte A, la CMB correspond au premier puits dont le nombre de germes présents sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^4 (Konan *et al.*, 2013).

I.14 Préparation de la boîte A

0.1 ml de la préculture, opalescent a été prélevé et délayé avec 10 ml de BMH. La suspension bactérienne obtenue a permis d'avoir environ 10^6 UFC/ml (condition standard) constituant ainsi l'inoculum initial de dilution 10^0 , les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ont été obtenues, l'inoculum pur et les quatre dilutions successives ont été ensemencés par des stries parallèles de 5 cm dans des boîtes de Muller Hinton gélose et incubés à 37 C° pendant 24 h. Cette préparation constituée la boîte A qui sera utilisé pour déterminer la CMB (Konan, 2015).

Chapitre II

Résultats et discussions

I. Matériel végétal

I.1 Taux d'humidité

La détermination d'humidité des feuilles de l'espèce *Marrubium vulgare* de la wilaya de Mostaganem a révélé un taux de 61.4 % (**Figure 19**).

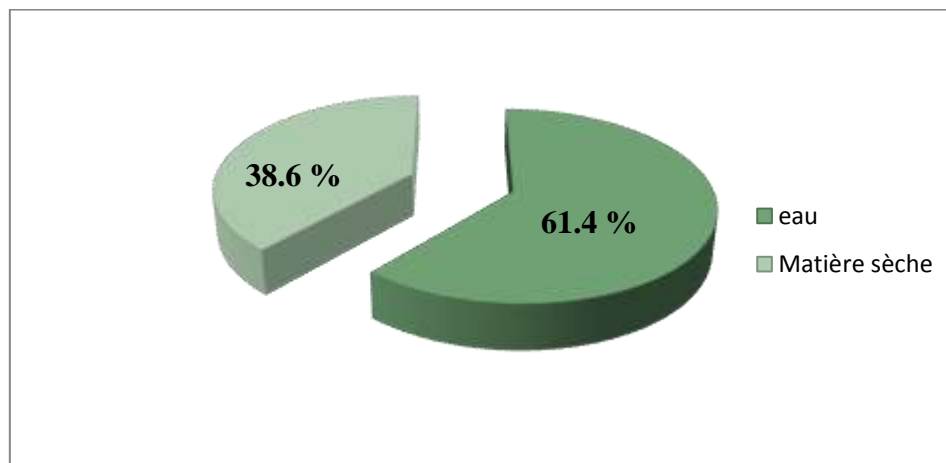


Figure 19: Taux d'humidité de l'espèce *Marrubium vulgare*.

Le marrube de Mostaganem a présenté un taux d'humidité nettement supérieur à celui de Mont de Tessala (Sidi Belabesse) 40.32%, (**Bouterfas et al., 2013**) les variations rencontrées dans les teneurs en eau, peut être dues à des facteurs environnementaux (conditions climatiques et répartition géographique).

I.2 Caractères organoleptiques des extraits

L'examen organoleptique des extraits de *Marrubium vulgare* (méthanoïque et acétonique) ont donné les résultats suivants (**Tableau 08**). Les deux extraits possèdent un aspect pâteux avec une coloration vert foncée.

Tableau 08 : Caractères organoleptiques des extraits.

Extraits de la plante		Aspects	Couleurs
<i>M.vulgare</i>	Méthanol	Pâte	Vert foncée
	acétone	Pâte	Vert foncée

I.2.1 Rendement d'extraction

Le rendement des extractions est calculé par rapport à la poudre végétale sèche utilisée (**Figure 20**).

Le meilleur rendement d'extraction est enregistré pour le solvant méthanol (8.15 %), alors que le rendement d'extraction est plus faible avec l'acétone (2.6 %).

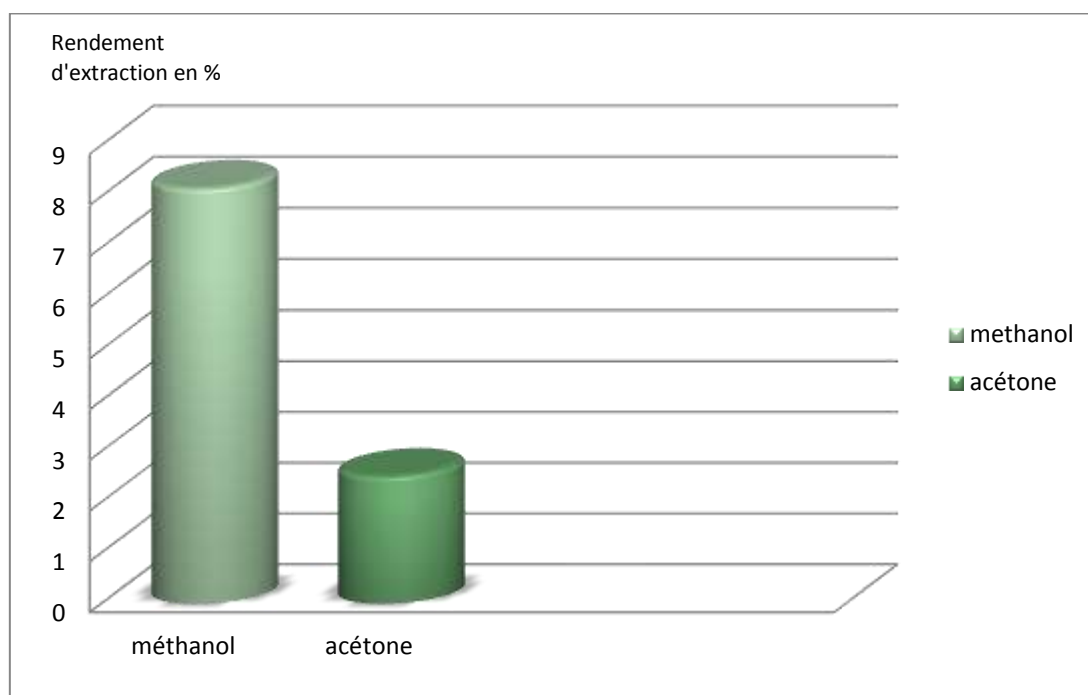


Figure 20: Rendement d'extraction des composés phénoliques de la plante étudiée.

La préparation de l'extrait méthanolique de la drogue végétale a donné un rendement de l'ordre de 1.63 g, ce qui correspond à un pourcentage de 8.15%. Ce rendement est supérieur à celui rapporté pour l'extrait aqueux du méthanol (4.57%) rapporté par **Shapaz et al., (2002)**, une autre étude réalisée par **Djahra et al., (2012)** sur l'espèce provenant de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien) a montré également un rendement de 5.90%, inférieur à celui de Mostaganem. Nous citons l'étude de **Ghedadba et al., (2014)** qui a permis d'obtenir à partir d'échantillon provenant de la région de Touffana à 52 km de la ville de Batna un rendement d'extraction de 10.9%. Le taux enregistré est supérieur comparé à celui obtenu dans la présente étude.

Erdogan-Orhan et al., (2010) ont réalisé une extraction par lixiviation à chaud (percolation type soxlet 8 à 12h) en utilisant l'acétone comme solvant d'extraction, ces auteurs en ont obtenus un rendement de 6.6%, valeur sensiblement supérieure à celle que nous avons obtenue dans cette étude (2.6 %).

Les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille, mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide –liquide "le solvant d'extraction, la taille des particules, la température, pH et le coefficient de diffusion de solvant" (**Djahra, 2014**) la variation de ces facteurs donne la naissance à une altération différentielle de la distribution des composés entre les deux phases solide-liquide (**Andrensek et al., 2004 ; Hayouni et al., 2007**).

Dans cette étude, la technique de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant polaire et la poudre végétale, étant donné que les solvants polaires ont la capacité de diffuser à l'intérieur de la poudre végétale, d'atteindre la matrice végétale et de récupérer par conséquent le plus possible des métabolites. En comparant cette technique avec les autres méthodes d'extraction, (**Hayouni et al., 2007**) ont démontré que la macération donne des rendements plus importants que l'extraction par soxlet, mais dans des cas particuliers le solvant utilisé pour l'extraction peut arriver à certain degré de saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraction au cours du procédé.

I.3 Screening phytochimique

La phytochimie qualitative basée sur des réactions colorées ou de précipitations par des réactifs chimiques spécifiques réalisés sur la poudre végétale de l'espèce étudiée, les résultats de ce criblage phytochimique est résumé dans le tableau suivant :

Tableau 9 : Résultats des tests phytochimiques de *Marrubium vulgare*.

Les tests phytochimiques		Les feuilles de <i>Marrubium vulgare</i>
Métabolites secondaires	Réactif	
Tanins	FeCl ₃	+++
	Tanins galliques	-
	Tanins catéchiques	++

Suite de Tableau 09 :

Alcaloïdes	Réactif Wagner		-
	Réactif Mayer		-
Flavonoïdes	Anthocyanes		+
	Flavonoïdes libres		++
	Leucoanthocyanes		-
Saponosides	Test de la mousse		+++
Stérols et triterpènes	Réaction de Libermann et Bouchardt		+++
Anthraquinones	Dérivés anthracéniques libres		-
	Dérivés anthracéniques combinés	O-hétérosides	+
		O-hétérosides à génine réduite	++
		C-hétérosides	++
Coumarine	Florescence UV		-
Autre caractérisation	Composés réducteurs	Liqueur de Fehling	-
	Musilage		+++

+++ : Fortement positif, ++ : Moyennement positif, + : Faiblement positif, - : négatif



Figure 21: Mise en évidence des tanins et caractérisation du tanin catéchique.



Figure 22: Présence des saponosides



Figure 23: Mise en évidence des flavonoïdes (hétérosides flavonoïques), les stérols et triterpènes.

D'après les résultats obtenus (**Tableau 9**), nous constatons que les feuilles de *M.vulgare* renferment différents principes actifs : les tanins catéchique (**Figure 21**), les flavonoïdes (hétérosides flavonoïques), les anthocyanes, les saponosides (**Figure 22**), les terpènes et stérols (**Figure 23**), en plus les Anthraquinones et le mucilage, révèlent également l'absence des métabolites secondaires importants tels que les alcaloïdes, les tanins galliques, leuco-anthocyanes, les coumarines et les composés réducteurs, nos résultats corroborent ceux obtenus par (**Kahlouche-Riachi et al., 2015 ; Djahra, 2014**). En effet, ces derniers ont indiqué la présence des flavonoïdes, tanin, saponosides et des stérols et triterpènes, à l'exception des alcaloïdes et les coumarines sont absente.

I.4 Etude de l'activité antimicrobienne

I.4.1 Identification phénotypique

I.4.1.1 Examen microscopique

- l'état frais et coloration de Gram

L'examen de l'état frais montre que la souche de *Pseudomonas aeruginosa* est des bacilles mobiles grâce à des flagelles.

Après la coloration de Gram la souche est apparue sous forme des bacilles roses. Elle possède une paroi à gram négatif (**Figure 24**).



Figure 24: Observation microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* après coloration de Gram (G×1000).

I.4.1.2 Examen macroscopique

À partir des cultures sur milieu ordinaire (gélose nutritive), la forme des colonies isolées est de grande taille avec un aspect bombé au centre présentant un reflet métallique et au contour irrégulier (**Figure 25**). La souche produit une pigmentation verte dans milieu king A, due à la présence des pyocyanines (**Figure 25**). De plus, une odeur caractéristique de la fleur de "seringa" due à la production d'orthoamino-acétophénone, provient de ces cultures (**Eyquem et Montagnier, 2000**).



Figure 25: A : Aspect macroscopique des colonies du *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu ordinaire

B : Production de pyocyanine par *Pseudomonas aeruginosa*

- **Recherche de catalase**

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et oxygène (O_2). Le dégagement des bulles d'air signifie que le test est positif et il ya une production d'enzyme de catalase (**Figure 26**).



Figure 26: Résultats positifs pour la recherche de catalase.

I.5 Antibiogramme

Les résultats d'étude de la sensibilité de la souche aux antibiotiques (**Tableau 10**) ont été déterminés suivant les valeurs de référence fournis par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (**CA-SFM, 2013**). La souche a montré une résistance (**Figure 27**) envers des antibiotiques appartenant à la famille des β - lactamines (Pipéracilline, Amoxicilline) et les céphalosporines (Cephalothin, Cephazoline), des études de (**Mesaros et al., 2007**) ont montré que le mécanisme de résistance au β - lactamines est très répandus chez *P.aeruginosa* et due à la production de Metallo β -lactamases (MBLs) ou le système d'effluve membranaire MexAB-OprM capable d'exporté les antibiotiques en dehors de la cellule (**Masuda et al., 2000**).

Nous constatons d'après les résultats obtenus dans cette étude que notre souche est totalement sensible aux antibiotiques testés appartenant aux groupes des Aminosides (Gentamycine, Amikacine, Tobramycine, Néomycine) et Fleuroquinoles (Norfloxacin) des travaux de (**Tripathi et al., 2011**) et (**Abdeli, 2017**) confirme notre résultat.

Tableau 10: Résultats de l'activité antimicrobienne des antibiotiques exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.

Agent antimicrobien		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
		Zone d'inhibition en mm	
Amikacine	AK	27.33±0.33	S
Norfloxacin	NOR	31.66±0.33	S
Tobramycine	TOB	24.66±0.66	S
Peperacilline	PRL	16±00	R
Neomycine	N	19.33±0.01	S
Naldixic acid	NA	22±0.66	S
Gentamicine	CN	25.33±0.33	S
Cephalothin	KF	00	R
Cephazoline	KZ	00	R
Amoxicilline	AML	00	R

Toutes les valeurs (zones d'inhibition incluant le diamètre du disque de 6 mm) sont exprimées en moyen de trois essais \pm écart type. ATCC : American Type Culture Collection.

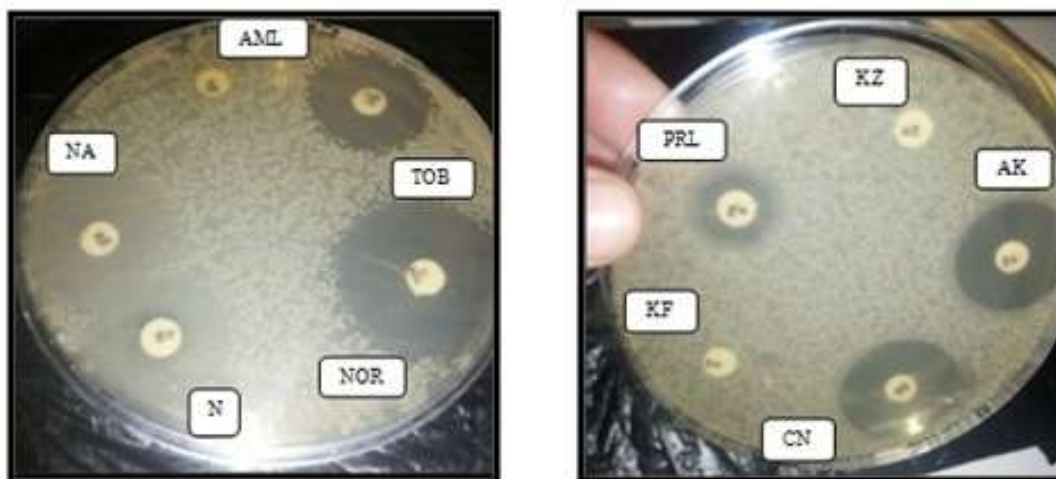


Figure 27: Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 aux antibiotiques testés.

I.6 Etude de l'activité antimicrobienne des extraits

I.6.1 Méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé

La méthode de diffusion sur gélose Muller-Hinton, c'est une technique qualitative a été utilisé pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits méthanolique et acétonique avec différentes concentrations (**Figure 29**). Le principe basé sur la détermination du diamètre des zones d'inhibition apparentée autour des disques chargés par l'extrait testés vis-à-vis une souche de référence (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

D'après les résultats obtenus dans cette étude, on note que l'efficacité activités antibactérienne de ces extraits diffère selon la nature de solvant d'extraction (**Figure 28**)

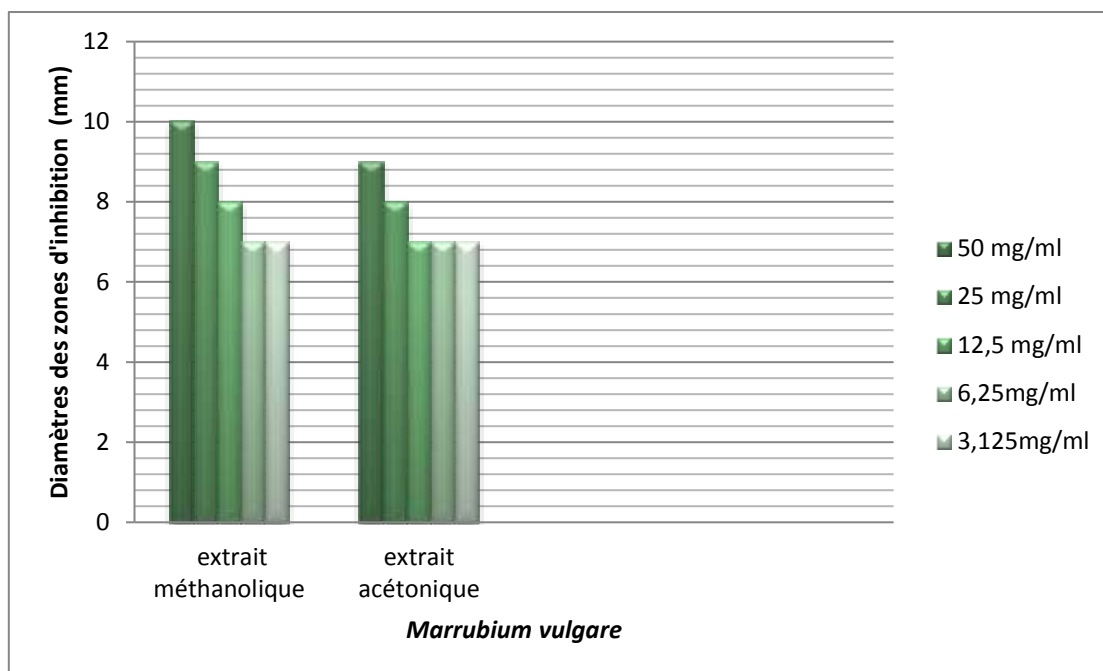


Figure 28: Résultats de l'activité antibactérienne des extraits phénoliques de *Marrubium vulgare* avec différentes concentrations.

Tableau 11: Diamètres des zones d'inhibition des extraits de la plante étudié.

Souche bactérienne	Extraits de la plante <i>Marrubium vulgare</i>	Diamètres des zones d'inhibition (mm)					
		50 mg/ml	25 mg/ml	12.5 mg/ml	6.25 mg/ml	3.125 mg/ml	C+ (NOR)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Méthanol	10±00	9±00	8±00	7±00	7±00	31.66±0.33
	Acétone	9±00	8±00	7±00	7±00	7±00	

- C+ = contrôle positif (Antibiotique Norfloxacine)
- Aucune zone d'inhibition n'a été obtenue pour le contrôle négatif (DMSO)

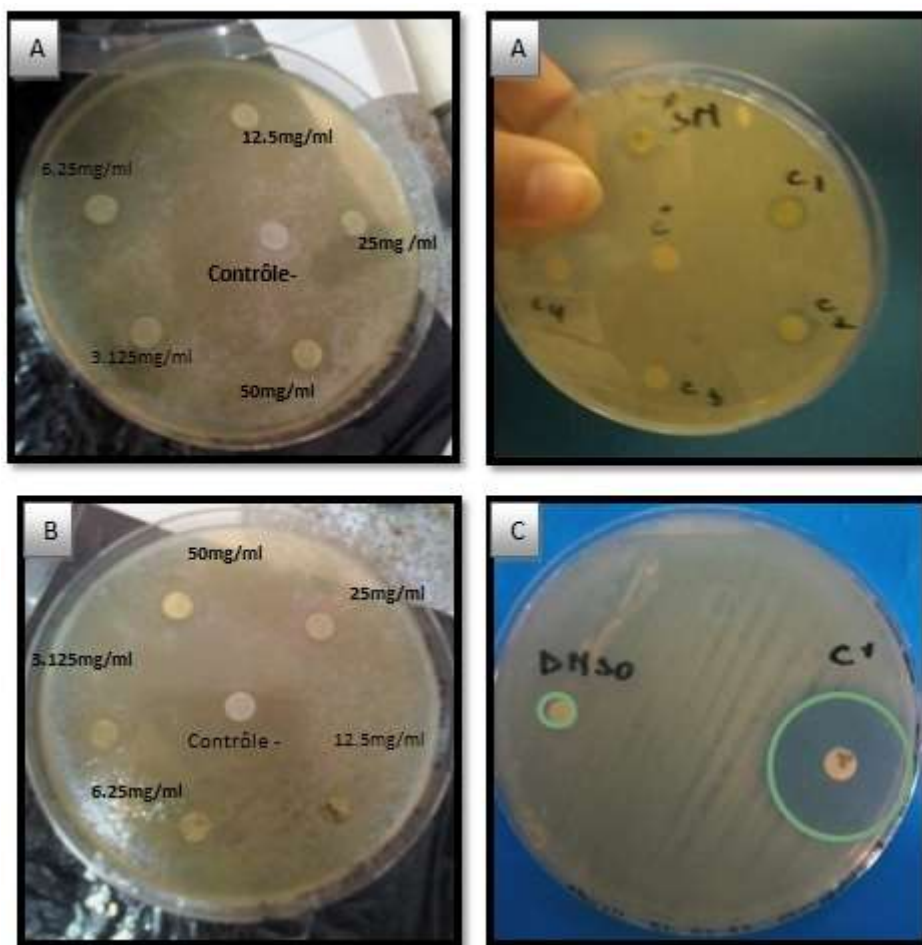


Figure 29: A, B résultats d'activité antibactérienne des extraits (méthanolique et acétonique), C : contrôle positif et négatif

D'après les résultats obtenus (**Tableau 11**), les zones d'inhibition diminuent avec la diminution de la concentration des extraits phénoliques testés. Des zones d'inhibition allant de 10 à 7 mm de diamètre ont été obtenues avec l'extrait du méthanol et de 9 à 7 mm pour l'extrait acétonique. La zone d'inhibition la plus importante (10mm) a été obtenue avec l'extrait méthanolique (50mg/ml).

Nos résultats ont révélé que les deux extraits méthanolique et acétonique de *Marrubium vulgare* possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis la souche testée à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) avec les différentes concentrations. Selon (**Ponce et al., 2003**) la souche est sensible à la substance lorsque le diamètre mesuré entre 9 et 14 mm.

Ces résultats sont proches de celui rapporté par (**Hamadache, 2011**). Autres résultats obtenus par le même auteur et (**Bokaein et al., 2013**) rapportent que l'extrait méthanolique de la plante possède une activité antibactérienne importante vis-à-vis une souche à Gram positif *S. aureus* ATCC 43300, il est rapporté que cette bactérie compte parmi les souches bactériennes les plus sensibles aux extraits de la plante (**Melendez et al., 2006**).

En dehors de l'Algérie, une étude faite par **Mubashir et al., (2008)** sur l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* inde a montré que cet extrait n'a aucune activité antibactérienne sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 424, les mêmes résultats ont été observés en Maroc par (**Kanyonga et al., 2011**).

D'après nos résultats, on constate que notre souche à Gram négatif est plus résistante aux extraits de la plante, les zones d'inhibition ne dépassent pas (10 mm), les mêmes observations fut rapporté par plusieurs auteurs (**Parekh et Chanda, 2007 ; Bokaein et al., 2013**), cet effet est dû à la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram, cette membrane est le premier obstacle aux molécules hydrophiles devant pénétrer la cellule de la bactérie pour la détruire, de plus les la densité des sucres et des chaînes latérales du LPS organise un filtre pour les autres substances (**Maan et al., 2000**), tous ces mécanismes permet aux *Pseudomonas aeruginosa* résister les agents antimicrobiens standard et les biocides naturels.

I.7 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) :

Selon **kablan et al., (2008)** la CMI permet de définir la sensibilité ou la résistance bactérienne, les deux paramètres (CMI ,CMB) ont été utilisés sur les deux extraits ayant représenté une activité antibactérienne vis-à-vis la souche (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 12, la CMI la plus faible est enregistrée pour l'extrait acétonique (1.56 mg/ml)et (3.12mg/ml) pour l'extrait méthanolique, ces résultats sont inférieur à celui rapporté par (**Hamadache, 2011**) et (**Khahlouche-Riachi, 2013**), tandis que la CMB (**Figure 30**) est supérieurs à celle rapportée pour les deux extrais de la plante, nous avons comparé les résultats avec la boîte A (**Figure 30**).

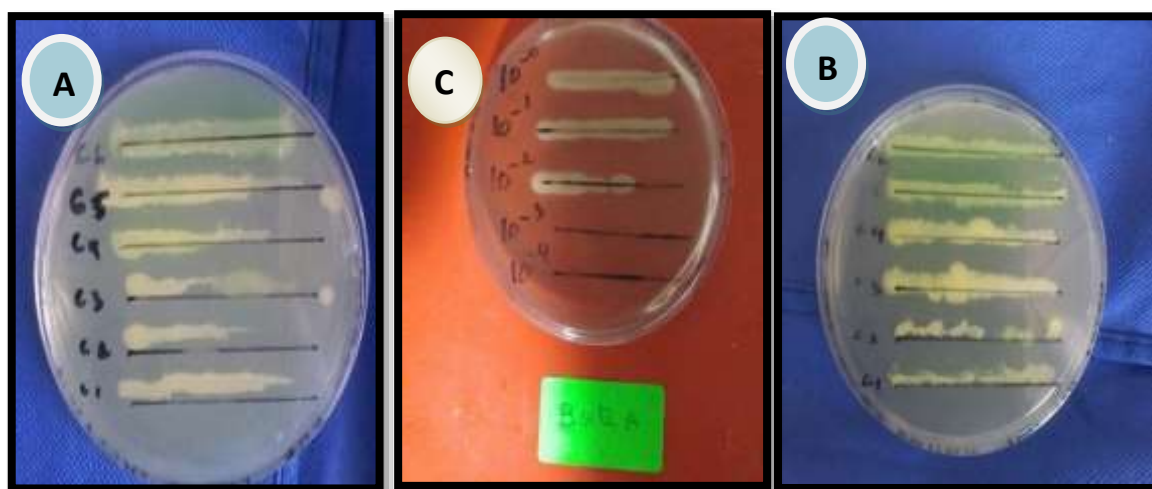


Figure 30: La CMB de l'extrait acétonique et méhanolique (A,B) des feuilles de *Marrubium vulgare* , C : La boîte A

Selon **Marmonier en 1990** :

- Si le rapport CMB/CMI ≤ 4 la substance testée est bactéricide
- Si le rapport CMB/CMI ≥ 4 la substance testée est bactériostatique

Tableau 12: Valeur des paramètres antimicrobiens des extraits de *Marrubium vulgare*

Extraits de la plante	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			
	CMI	CMB	CMB/CMI	Activité
Méthanolique	3.12mg/ml	>50	>16.02	bactériostatique
Acétonique	1.56 mg/ml	>50	>32.05	bactériostatique

Les extraits de *Marrubium vulgare* exercent un effet bactériostatique selon le rapport CMI/CMB (**Tableau 12**), il est bien établi que certaines composés bioactifs des plantes dont les polyphénols notamment les tanins et flavonoïdes sont reconnus par leur activité antibactériennes (**Hamadache, 2011**).

Conclusion

Conclusion

Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source de chimiodiversité, et l'alternative dans l'industrie pharmaceutique. Dans l'optique de comprendre l'usage de *Marrubium vulgare*, en thérapie folklorique, dans la prise en charge de certaines pathologies infectieuses due à la présence des bactéries multirésistances.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits phénoliques d'une plante médicinale locale.

Durant ce travail, la plante médicinale a été sélectionnée pour évaluer, *in vitro*, l'activité antibactérienne de leurs extraits phénoliques vis-à-vis d'une souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Le criblage phytochimique des feuilles de *Marrubium vulgare* a révélé la présence de différents métabolites secondaires. Il s'agit essentiellement des tanins, flavonoïdes, stérols et triterpènes, saponosides. Ces constituants connus par leurs diverses propriétés biologiques.

L'extraction par macération de *Marrubium vulgare* à Mostaganem a donné des rendements respectifs de 8.15 % et 2.6 % pour l'extrait méthanoïque et acétonique, leurs extraits ont présenté une bonne activité antibactérienne sur la souche testée. Cependant, leur efficacité diffère d'un extrait à un autre et les diamètres des zones d'inhibitions diminuent avec la diminution de la concentration.

La zone d'inhibition la plus large a été obtenue avec l'extrait méthanoïque, la CMI la plus faible a été enregistrée pour l'extrait acétonique (1.156 mg/ml) vis-à-vis la souche à tester, tandis que la CMB est supérieure à la concentration utilisée.

Cette étude a permis d'un point de vue fondamentale de mieux connaître l'importance des extraits phénolique de la plante étudiée, nos résultats constituent une première étape à la recherche des solutions viables aux problématiques des infections nosocomiales et l'antibiorésistance, mais elle reste néanmoins préliminaire, des recherches plus approfondies s'avèrent nécessaires pour éclairer certains points. En perspectives, les recommandations suivantes sont suggérées :

- Identification des constituants actifs responsables de l'activité antibactérienne observés de *Marrubium vulgare*
- Test de l'efficacité des extraits sur la formation de biofilm

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abadi A et Hassani A, 2013**, Essential oil composition and antioxidant activity of *Marrubiumvulgare*L. Growing wild in Eastern Algeria,**9**(1), 17-24p.
- **Abdelli W,2017**, Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperusphoenicaet* de *Thymus vulgaris*. Thèse de doctorat, Université Abd el Hamid Ibn Badiss de Mostaganem, 214p.
- **Marouf A et Raynoud J, 2007**, La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p.
- **Aharoni A., Jongsma M., Bouwmeester H.J, 2005**, Volatile science, Metabolic engineering of terpénoïds in plants. *Trends plant Sci*, **10** : 594-602p.
- **Ait Chabane O, 2018**, Etude des effets antimicrobiens des extraits bruts, phénoliques et à base d'huiles essentielles du Miswak (*Salvadorapersica*) sur les microorganismes responsables des infections buccales (caries dentaires, gingivite, parodontite, candidoses...etc).Thèse de doctorat, Université Abd Elhamid Ibn Badis, Mostaganem.187 p.
- **Ali-Shtayeh MS., Yaghmour RM., Faidi YR., Salem K., Al-Nuri MA, 1998**, Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of ethnopharmacology*, **60**:265-271p.
- **Andrensek S., Simonovska B., Vovk I., Fyhrquist P., Vuorela H., Vuorela P, 2004**,Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercusrobur*) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom®. *Int. J. Food Microbiol*, **92**:181-7p.
- **APG: Angiosperms PhylogenyGroup III, 2009**, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plantes: APG III. *Bot. J. Linn. Soc*, **161**: 105-121p.
- **Baba Aïssa F, 1999**, Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident", Librairie Moderne Rouiba, EDAS, Alger, 368p.
- **Barbier F., Wolff M, 2010**, Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* vers l'impasse thérapeutique,*medecine/sciences*,**26** : 960-8p.
- **Benbelaid F, 2015**, Effets des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques sur *Enterococcusfaecalis* responsable d'infections d'origine dentaire.Thèsede doctorat, UniversitéAbouBekrBelkaid, Tlemcen,169p.
- **Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., DesjobertJ.M. Bernardini A.F. & Costa J, 2008**, Antimicrobial activity and chemical composition

of (*Origanum glandulosum* Desf.) essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *Food Chem*, **106**:132–39p.

- **Bendif H, 2017**, caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae : *Ajugaiwa* (L.) Schreb., *Teucrium polium* L. *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* (Boiss & Reut.) Greuter & Burdet et *Rosmarinus eriocalyx* Jord & Fourr. Thèse de doctorat, L'école normale supérieure de Kouba, Alger, 199p.
- **Bendriss, H, 2013**, Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de: *Ruta chalepensis* et *Marrubium vulgare*. Mémoire de magister, Université Hassiba Ben Bou Ali, Chlef, 186p.
- **Ben Gueddeur I, 2002**, Etude in vitro de l'activité antimittotique de certaines plantes médicinales. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Rabat, 117p.
- **Benkhniqeu O., Benakka F., Salhi S., Fadli M., Douira A., Lahcen Z, 2014**, Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc), *Journal of Animal & Plant Sciences*, **23** :3539-3568p.
- **Bellakhdar J, 1997**, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires : la pharmacopée marocaine traditionnelle. Paris, Ibis Press, 172p.
- **Beloued A, 2004**, Plantes médicinales d'Algérie, offices des publications universitaires, Algérie, 275p.
- **Benhammou N, 2011**, Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat, Université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen, 174p.
- **Berche P., Gaillard J., Simont M, 1996**, Bactériologie, les bactéries des infections humaines, Ed Lavoisier, Paris, 1116p.
- **Biyiti L.F., Meko'o D.J.L., Tamze V., Amvam Zollo P.H, 2004**, Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharmacie Médicale Traditionnelle Africaine*, **13** :11-20p.
- **Blot N., Gouillien J, 2012**, Atlas illustré des plantes médicinales curatives, édition S.A, Asie, 285p.

- **Bokaein M.,Saboori I.,Saeidi S., Niazi A.,Khaj H., Bazi S, 2013**, Phytochemical Analysis, Antibacterial Activity of *Marrubium vulgare L* against *Staphylococcus aureus in vitro*, *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*,**16** (10), 60-64p.
- **Bruneton J, 1999**, Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 1120p.
- **Bruneton J, 2009**, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} édition, Lavoisier, Paris, 1269p.
- **Breidenstein EBM., Fuente-Nunez C., Hancock REW, 2011**, *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, **19**: 419-426p.
- **Boudjelal, A, 2013**, Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. 95p.
- **Bouhaddouda N., Aouadi S., Labiod R, 2016**, Evaluation of Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil and Methanolic Extract of *Origanum vulgare L. ssp. glandulosum (Desf.) Ietswaart* from Algeria, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, **8**(1), 104-112p.
- **Boukef M.K, 1986**, "Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Médecine traditionnelle et pharmacopée", Librairie Larose, Paris, 350p.
- **Bouterfas K., Mehdani Z., Lattrache A., Hazem Z., Bouredja N, 2013**, Quantification de quelques polyphénols de *Marrubium vulgare L* du mont de Tessala (Algérie occidentale) pendant deux périodes de végétation et floraison, *Les technologies de laboratoire*, **31**(8), 34-36p.
- **Canales M., Hernandez T., Caballero J., Romo de Vivar A., Avilaa G., Duran A., Lira A, 2005**, Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, Mexico. *J. Ethnopharmacol*, **97**: 429-39p.
- **CA-SFM, 2013**, Comité de l'Antibiogramme de la société Française de Microbiologie.
- **CA-SFM, 2018**, Comité de l'Antibiogramme de la société Française de Microbiologie.
- **Chabrie JY, 2012**, Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat, Université de Henri Poincaré, Nancy, 184p.

- **Choi YM., Noh DO., Cho SY, 2006**, Antioxidant and antimicrobial activities of Propolis from several regions of Korea. *LWT*, **39**: 756–61 p.
- **Cushnie T.P.T., Lamb A.J, 2011**, Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids, *Int J Antimicrob Agents*, **38**: 99-107p.
- **Dayane Otero R., R.C.C., Paulo P., Gontijo F, 2009**, Ventilator Associated Pneumonia (VAP) caused by Multidrug-Resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* vs. other microorganisms at an adult clinical-surgical intensive care unit in a Brazilian University Hospital: Risk factors and outcomes. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, **1**(10), 432-437 p.
- **Dehimi KH, 2011**, Etude de quelques propriétés des extraits de *Thymelaeamicrophylla*Coss. Et Dur. Mémoire de magistère, Université Mohamed Khider, Biskra, 76p.
- **Delarras C, 2007**, Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Lavoisier, Paris, 476p.
- **Deramchia, N, 2018**, Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et extraits brutes de *Thymelaea hirsuta*. Thèse de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, 153p.
- **Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traré A., Coulibaly K., Maïga A, 2004**, Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritianalam*. (*Rhamnaceae*), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali.*C.R.Chimie*, **7** :1073-1080p.
- **DjahraA., Bordjiba1 O., Benkherara S, 2012**, Activité antibactérienne des flavonoides d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare L.* de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien). *Rev. Sci. TechnolSynthèse*, **24** : 29-37p.
- **Djahra, A.B., Bordjiba, O., Benkherara, S, 2013**, Extraction, separation et activité antibactérienne des tannins de marrube blanc (*Marrubiumvulgare L.*), *Metaboliccapacities of threestrainsof Pseudomonasaerogénosa to biodegradecrudeoil*, **11** :348-352p.
- **Djahra A, 2014**, Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubiumvulgare L.*Thèse de doctorat, Badji Mokhtar, Annaba, 114p.

- **Dubois V., Arpin C., Melon M., 2001**, Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. *J Clin Microbiol*, **39**:2072-8p.
 - **Duraffourd C., Lapraz J.C., et Chamliir, 1997** « La plante médicinale de la tradition à la science ». Edition Grancher. 538p.
 - **El Maskoui A., Bousta D., Dahchour A., Greche H., Harki A., 2008**, Plantes médicinales et aromatiques marocaines opportunités et déficit, *Revue AFN, Maroc* **2-3** :74-75 p.
 - **Elyajouri A., 2012**, Infections à *Pseudomonas aeruginosa* : Actualités. Thèse de doctorat, Université Mohammed v-Rabat, 173p.
 - **Emerson J., McNamara S., Buccat AM, 2010**, Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. *Pediatr Pulmonol*, **45** : 363-70p.
 - **Epelboin L., Macey J, 2009**, Maladies infectieuses et transmissibles, Elsevier Masson, Paris, 425p.
 - **Erdogan-Orhan E., Belhattab R., Senol FS., Gülpinar AR., Hosbas S., et Kartal M, 2010**, Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species, *Industrial Crops and Products*, **32**:566-571.
 - **Eschbach M., Schreiber K., Trunk K., Buer J., Jahn D., Schobert M, 2004**, Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *Journal of Bacteriology*, **186** (14), 4596-4604p.
 - **Eyquem A., Montgneir L, 2000**, Trité de microbiologie clinique: deuxièmes mises à jour et complements. PICCIN, Itali, 238p.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. & Abdelly C., 2008**, Phenolic composition of *Cynaracardunculus L.* organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, **331**: 372-9p.
- **Fettah A., Djouama M., Lamara K, 2018**, Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits naturels d'une sous espèce de *Teucrium polium L.*, cultivé dans la région de Biskra de Beni Souik, Biskra, *Courrier du Savoir*, **26** : 357-362

- **Filiatrault MJ., Wagner VE., Bushnell D., Haidaris CG., Iglewski BH., and Passador L, 2005**, Effect of anaerobiosis and nitrate on gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, **73**(6), 3764-3772 p.
- **Ghdadba N., Hambaba L., Aberkan MC., Oueld Mokhtar SM., Farcha N, 2014**, Evaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium Vulgare*, **2**(2), 64-74p.
- **Grare M, 2016**, Evaluation du risque d'émergence de résistances de *Pseudomonas aeruginosa* à différents antibiotiques antipyocyaniques en réanimation. Thèse de doctorat, Université Toulouse III-SABATIER, 100p.
- **Guillaume L, 2015**, contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chicorée : approches biochimique et moléculaire. Thèse de doctorat, Université de Lille 1, France, 348p.
- **Guit A., 2011**, l'apport de *MARRUBIUM VULGARE L.* dans la prévention du risque cardiovasculaire. Thèse de doctorat, Université de Nantes, France, 83p.
- **Hamadache N, 2011**, Criblage des extraits phénoliques d'origine végétale doués d'activité antibactérienne : recherche des inhibiteurs naturels de β -lactamases. Mémoire de magistère, Université A/Mira de Bejaia (UAMB), 100p.
- **Haond C., Tisoo T., Allaouchiche B, 1996**, Infection nosocomiale en réanimation une année de surveillance portant sur 248 patients de réanimation chirurgicale. *Med. Mal. Inf*, **26** : 1150- 4p.
- **Haouli, N, 2015**, caractérisation phytochimique et biologique du contenu tannoïde de « *Marrubium vulgare* » et « *Urticaurens* » de zones arides et semi arides. Thèse de magister, Université El Arbi Ben M'hidi, Oum Bouaghi, 82p.
- **Hartmann T, 2007**, from waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, *Review. Phytochemistry* **68**: 2831–2846 p.
- **Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M., & Hamdi M, 2007**, the effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian (*Quercus coccifera L.*) and (*Juniperus phoenicea L.*) fruit extracts. *Food Chem*, **105**: 1126-34p.
- **Heller R., Nault R., Lance C, 1998**, Physiologie végétale. Tome 1 : Nutrition. 6ème édition de l'abrégé Dunod. 322p.
- **Hseini S., Khahwouaji A, 2007**, Etude ethnobotanique de la flore médicinale dans la région de Rabat (Maroc occidental), *LAZAROA*, **28**: 79-93.

- **Ionut P., Liktor-Busa Z., Touzard T., Chaieb M., Urbán E and Hohmann E, 2015**, Study of in vitro antimicrobial and antiproliferative activities of selected saharan plants, *Acta Biologica Hungarica*, **66**(4), 385–394p.
- **Jandi M, 2011**, plantes médicinales en dermatologie et cosmetology: enquete auprès des herborist de la region de Béni Mellal. Thèse de doctorat, Université de Marrakech, 155p.
- **Jeannot K., Plésiat P, 2016**, Epidémiologie de la résistance aux β -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal des Anti-infectieux*, **18**(2), 52-63p.
- **Jimenez PN., Koch G., Thopson JA., Xavier KB, 2012**, The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **76**(1), 46–65p.
- **Jitendra M., Vaibhavi J., Kiran S, 2012**, Antimicrobial activity of Some Ethno-medicinal Plants used by Baiga Tribes from Amarkantak, India , *Advances in Life Science and Technology*, **4**:19-20p.
- **Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Steven P, 2002**, Botanique systématique : Une perspective phylogénétique. 1ère Ed : Paris et Bruxelles, 884 p.
- **Kablan B.J., Adiko M., Abrogoua D.P, 2008**, Evaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoecrenata* et de *Manoteslongiflora* utilisées dans les ophtalmies en Côte d'Ivoire. *Phytothérapie*, **6**: 282-8 p.
- **Kabouche A , 2005**, Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des lamiaceae. Thèse de doctorat, Université Mentouri, Constantine, 389p.
- **Kahlouche-Riachi F, 2014**, Evaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d'Algérie. Thèse de doctorat, Université Mentouri, Constantine, 148p.
- **Kahlouche-Riachi F., Djerrou Z., Ghoribi L., Djaalab I., Mansour-Djaalab H., Bensari C., Hamdi-Pacha Y, 2015**, Chemical Characterization and Antibacterial Activity of Phases Obtained from Extracts of *Artemisia herba alba*, *Marrubium vulgare* and *Pinus pinaster*, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, **7**(2), 270-274p.
- **Kanyonga KM., Faouzi MA., Meddah B., Mpona M., Essassi EM and Cherrah Y, 2011**, Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **3**(1), 199-204p.
- **Kasongo-kakupa D., Klenga-Muenze P., Byl B., et Dramaix-Wilmet M, 2016**, Etude

de la prévalence des infections nosocomiales et des facteurs associés dans les deux hôpitaux universitaires de Lumbashi, République Démocratique du Congo : cas des cliniques Universitaires de Lumbashi et Hôpitaux Jason.Sendwe,*PanAfrican Journal*,**24**(6), 2-3p.

- **Kebili, Z., 2016**, Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits d'Ephedraalata de la région d'Ouargla. Mémoire de magister, Université KasdiMerbah, Ourgla, 87p.
- **Khitri W., Lachgueur N., Tasfaout A., Lardjam A., khalfa A., 2016**, Plantes antilithiasiques utilisées en médecine traditionnelle dans la ville d'Oran, Algérie, *Ethnobotanicalsurveyand phytochemical screening*, **8** : 328-332p.
- **Konan K.F, 2015**, Activité antibactérienne sur les enterobactéries productrices de bêta-lactamases a spectre élargi, et potentiel antioxydant in vitro de *Terminalia glaucescens* planch ex benth. (Combretaceae), une plante médicinale ouest-africaine. Thèse de doctorat, Université d'Abidjan (Côte d'Ivoire), 183 p
- **Lahouel M., Boulkour S., Segueni N. & Fillastre J.P, 2004**, Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathol. Biol*, **52** :314–22p.
- **Lardry J-M., Haberkorn V, 2007**, L'aromathérapie et les huiles essentielles, *KinesitherRev*, **61**:14-7p.
- **Lattab A., 2018**, Effet des composés naturels sur l'adhérence et la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, 215p.
- **Laurent H, 2003**, Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'Hydroxy Cinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT).Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg 1, 289p.
- **Madjdoub H, 2006**, Etude phytochimique et activité biologique de zygophyllum geslinicoss. Mémoire de magistère, UniversitéAboubakrBelkaïd, Tlemcen, 172 p.
- **Mann C.M., Cox S.D., Markham J.L,2000**, The outer membrane of *pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749; contribution to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil),*Lett. Appl. Microbiol*, **30**: 294-5p.

- **Masoodi M.H., Ahmed B., Zargar I.M., Khan S.A., Khan S., Singh P, 2008,** Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubiumvulgare*. *Afr.J. Biotechnol.* 7(2), 86-7p.
- **Marmonier AA, 1990,** Introduction aux technique d'étude des antibiotiques, Bactériologie Médicale, Techniques Usuelles ,227-236.
- **Melendez P.A., Capriles V.A, 2006,** Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine*, **13**: 272-6p.
- **Mérens A., J.P., Bargues L.,Cavallo JD, 2013,** Infections à *Pseudomonas aeruginosa*.*EMC-Maladies infectieuses*, **10**(1) ,1-18p.
- **Merzougui A., Ben Helel B., HanachiH.,Metjaouel B., Brini A.,Barkallah M.,Ben Rejebc, Said-Latiri C,2018,** Facteurs de risque de l'infection nosocomiale Bactérienne au niveau d'un centre de néonatalogie du Centre Tunisien. « Étude cas-témoin » : à propos de 184 cas,*Journal de pédiatrie et de puériculture*,**31** :18-26p.
- **Mesaros N., Nordmann P., Plesiat P., Roussel M., Jakobs F, 2007,** *Pseudomonas aeruginosa* : resistance et option thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire, *Douvain médical*, **126**(8), 305-316p.
- **Messioughi, M, 2010,** Analyse des substances actives « les flavonoïdes» et action antibactérienne d'une fabacé à intérêt médicinal « *Medicagosativa.L.*» cultivée sur des sols du Nord-Est algérien. Mémoire de magistère, Université Badji Mokhtar, Annaba. 180p.
- **Molina-Salinas GM., Ramos-Guerra MC., Vargas-Villarreal J., Mata-Cardenas, BD., Becerril-Montes P., Saïd-Fernandez S, 2006,** Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Flourensiacernua* DC against Strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Arc. Med. Res*, **37**: 45-49p.
- **Mubashir H., Massodi H., Babar A, 2012,** Isolation and caracterisation of pentacyclitriterpene from whole plant of *Marrubium vulgare L.* *Journal of pharmacy research*,**5** (5), 2668-2671p.
- **Muthu C., Ayyanar, M., Raja, N.,Ignacimuthu S, 2006,** Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*.
- **Nait SaidN, 2007,** Etude phytochimique des extraits chloroformiques des plantes :
- « *Pituranthoschloranthus* » ET « *Marrubiumvulgare*». Mémoire de magister, Université El-Hadj Lakhdar, Batna, 155p.

- **Norman R., Fornsworth O., Akerele Audrey S., Djaja D., &Zhengang G, 1986**«Place des plantes médicinales dans la thérapeutique ». Bulletin de l'organisation mondiale de la santé, 27-44.1975p.
- **Nyaledome-Ablavi I, 2016**, *Pseudomonas aeruginosa*: épidémiologie en état actuel des résistances à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed v. Thèse de doctorat, Université Mohammed v-Rabat, 116p.
- **Obam-Oconga L, 2009**, Etude phytochimique,Activité antimicrobienne et antioxydant de quelques plantes aromatiques et médicinales d'Afrique.Thèse dedoctorat, UniversitéWagadougou, 277p.
- **Obritsch MD., Fish DN., MacLaren R., Jung R, 2002**, National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002, *Antimicrob Agents Chemother*,**48** : 4606-10p.
- **OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 2002**, Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. WHO/EDM/TRM/2002.1, Genève, Suisse, 135p.
- **Ouattara L.H., Kabran M.G.R., Kadja A.B., Tano B. M., Mamyrbekova-Békro J. A., Békro YA, 2016**, Etude phytochimique activité, anti-oxydante d'extraits de plantes de Côte d'Ivoire utilisés dans le traitement traditionnel des hémorroïdes, *International Journal of Innovation and AppliedStudies*,**15**(4), 881-893p.
- **Parekh J.,Chanda S.V, 2007**, In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysisof some Indian medicinal plants, *Turk. J. Biol*, **31**:53-8p.
- **Philips D., Lister. Daniel J., Wolter., Nancy D. Hanson A,2009**, Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms,*ClinicalMicrobiologie Review*,**4**(22), 582-610p.
- **Pitt T.L, 1998**, *Pseudomonas, Burkholderia*, and related genera, Microbiology and Microbial Infections, *Oxford University Press Inc*, New York, **2**: 1109-1138p.
- **Pokra M., Pundir S., Dileep K., Harsha R., Jyoti R and Pushpa M, 2016**, Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and its Antibiotic Susceptibility Pattern to Restraint Hospital Acquired Infection,*International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*,**5**(9), 73-83 p.
- **Ponce A.G., Fritz R., Del Alle C., Roura S.I, 2003**, Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-WissenschaftundTechnologic*, **36**: 679-684p.

- **Prescot M.,Harley J-P., Clein DA, 2003**, Microbiologie de Boeck, Bruxelles, 137p.
- **Quezel, P., and Santa S, 1963**, Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. 2 Tomes, Editions CNRS, Paris, 1170p.
- **Radojević I., Stanković M., Stefanović O., Čomić L., Topuzović M., VasićS.,andNikolić M, 2013**, ExploringAntimicrobial Activity Of Horehound, *Marrubium peregrinum L. EXTRACTS,Kragujevac J. Sci.* **35** : 99-106p.
- **Raynaud J, 2007**, Prescription et conseil en phytothérapie. Ed : Tec & Doc. Paris. 149p.
- **Richards MJ., Edwards JR., Culver DH., Gaynes RP, 1999**, Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National nosocomial infections surveillance system, *Crit Care Med*, **27**: 887-92p.
- **Roman RR. Aharcon AF., Lara LA., Flores SJL, 1992**, Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Archives of Medical Research.***23** (1). 59-64 p.
- **Sahpaz S., Garbacki N., Tits M., Bailleul F, 2002**, Isolation and pharmacological activityof phenylpropanoid esters from *Marrubiumvulgare*.*J. Ethnopharmacol.***79**:389-92p.
- **Schlempher V, 1996**, Antispasmodie effects of hydroalcoholic extract of *Marrubiumvulgare* on isolated tissues, *Phytomedecine*, **3**(2), 211-216p.
- **Singleton P,2004**, Bactériologie pour la médecine, la biologie et biotechnologie, 6^{ème} édition, DUNOD, Belgique, 210p.
- **Shorr AF,2009**, Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit. *Crit Care Med*,**37** : 1463-9p.
- **Salhi S., Fadli M., Lahcen Z., Douira A, 2010**, Etudes floristique et ethnobotanique desplantesmédicinales de la ville de Kénitra (Maroc),*LAZAROA*, **31**: 133-146p.
- **Sofowora A, 1993**, Medicinal plants and traditional medicine in Africa. Ed Spectrum Books, Ibadan, 150p.
- **Sofowora A, 2010**, Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, Edition Karthala, 122p.
- **Stover CK., Pham XQ., Erwin AL., Mizoguchi SD., Warrenner P., Hickey MJ., Brinkman FS., Hufnagle WO., Kowalik DJ., Lagrou M., Garber RL., Goltry L., Tolentino E., Westbrook Wadman S., Yuan Y., Brody LL., Coulter SN., Folger KR., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong GK., Wu Z.,**

Paulsen IT., Reizer J., Saier MH., Hancock REW., Lory S et Olson MV, 2000, Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*, **406** (6799), 959-964p.

- **Tahri N., El Basti A., Zidan L., Rochdi A., Douira A, 2012,** Etude Ethnobotanique Des Plantes Medicinales Dans La Province De Settat (Maroc), *Journal of Forestry Faculty*, **12**(2), 192-208p.
- **Tasseau F., Baron D, 1989,** Infections nosocomiales, BRUKER Get FASSIN D, *ed Santé publique, Paris : Ellipses*, **45**:478-79.
- **Teuscher E., Anton R., Lobstein A, 2005,** Plantes aromatiques Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 521p
- **Tiwari R.P., Bharti S.K., Kaur H., Dikshit R., Hoondal G, 2005,** Synergistic antimicrobial activity of tea and antibiotics, *Indian J. Med. Res.*, **122**:80-84p.
- **Toty AA., Guessennd N., Bahi C., Kra A.M., Otokore D., Dosso M, 2013,** Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes, *Bulletin de la société Royale des Sciences de Liège*, **82**: 12-21p.
- **Toure D, 2015,** Etudes chimiques et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de doctorat, Université Félix Houphouët, Biogny, 153 p.
- **Tournus C, 2016,** Validation de l'identification des *Pseudomonas sp.* par spectrométrie de masse type MALDI-TOF via la caractérisation d'une collection de souche environnementales et cliniques. Thèse de doctorat, Université Rouen. 155p.
- **Trease G.E., Evans W.C, 2002,** Pharmacognosy, 15ème édition, Saunders Publishers, London. 584p.
- **Tripathi P., Banerjee G., Saxena S., Gupta SM., Ramteke PW, 2011,** Antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of lower respiratory tract infection. *African Journal of Microbiology Research*, **5**(19), 2955-2959p.
- **Vergara-Galicia J., Aguirre-Crespo F., Tun-Suarez A., Aguirre-Crespo A., Estrada-Carrillo M., Jaimes-Huerta I., Flores-Flores A., Estrada-Soto S, 2012,** Acute hypoglycemic effect of ethanolic extracts from *Marrubium vulgare*, *Phytopharmacologie*, **3** (1), 54-60p.

- **Vander W.C., Pierard A., Kley-Raymann M., Haas D, 1984**, *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *Journal of Bacteriology*, **160**(3), 928-934p.
- **You Essoh C, 2013**, Etude épidémiologique de souche, *Pseudomonas aeruginosa* responsable d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutiques, Thèse de doctorat, Université Paris-sud XI. 224p.
- **Weel K.G.C, 1999**, Antioxydant activity of horehound (*Marrubium vulgare L*) grown in Lithuania, *Fett/Lipid* **101**, **10**: 395-400p
- **Wichtl M., Anton R, 2003**, Plantes thérapeutiques : Traditions, Pratique officinale, Sciences et Thérapeutique. 2ème Ed: TEC & DOC, Paris, 364p.

Аничехе

Annexe 01



Figure 01 : Absence des dérivés anthracéniques libres

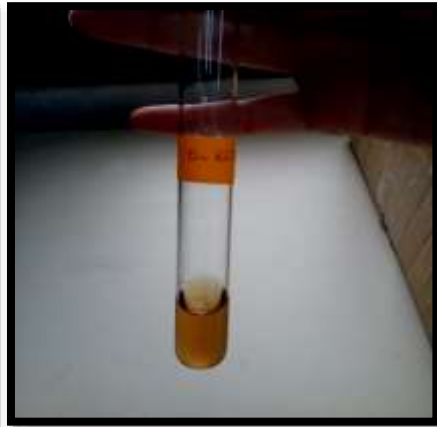


Figure 02 : Mise en évidence O-hétérosides



Figure 03 : Exemple de deux testes réalisés sur la mise en évidence de C-hétérosides et O-hétérosides réduit



Figure 04 : Présence des Mucilage

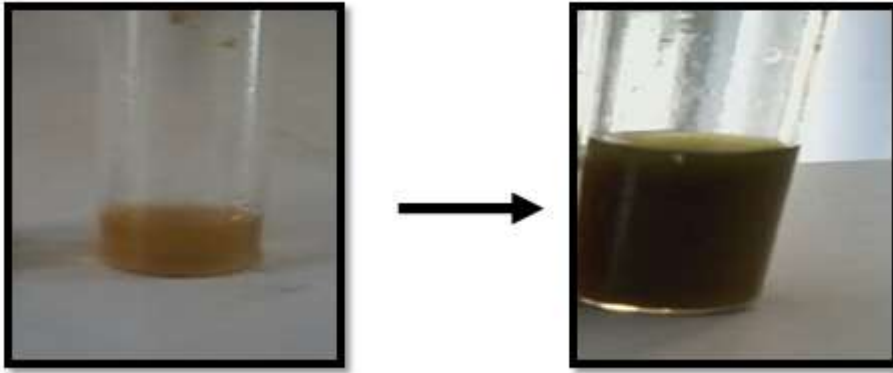


Figure 05 : changement de couleur indique la présence des anthocyanes

Annexe 2


Coloration de Gram :

Réaliser un frottis ou un étalement.

- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50-60°C (brièvement supportable à la main), ce qui les sèche puis laisser refroidir la lame.
- Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 1 mn.
- Laver à l'eau en transvasant les lames ou sous le robinet.
- Immerger (ou inonder) les lames dans du Lugol pendant 1 mn en les agitant.
- Laver à nouveau à l'eau.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.
- Laver à l'eau.
- Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50°C. Les lames doivent être parfaitement sèches.
- Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion



Test Catalase :

Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu gélosé à l'aide d'une pipette Pasteur boutonné dans l'eau oxygénée à 10V.



Remarque : l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalasique, ce que l'on vérifiera facilement par un test sans bactérie.

4. Lecture

Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :
Catalase + 	Catalase - 

Observation à état frais :

L'observation est réalisée par une petite goutte de l'eau physiologique stérile qui est déposée à l'aide de pipette pasteur au centre d'une lame stérile. On prélève une partie d'une colonie bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée et on la dissocie dans la goutte on applique ensuite une lamelle stérile sur la goutte en évitant la formation des bulles d'air.

Annexe 03

MILIEUX DE CULTURE :

▪ Bouillon nutritif (BN) (g/l)

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7,3 ± 0,2

▪ Gélose nutritive (GN) (g/l)

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	3 g
Extrait de levure.....	3 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Agar.....	18 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7,3 ± 0,2

▪ Mueller Hinton gélosé (M-H) (g/l)

Extrait de viande.....	3
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5 g
Amidon.....	1,5g
Agar.....	16 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7,3.

Milieu King A

Peptone de caséine	20g
Sulfate de potassium	10g
Chlorure de magnésium	1,4g
Glycérol	10mL

Agar 20g

Eau distillée : 1000mL

pH : 7,2 pH : 7,2

Composition des réactifs utilisés pour le screening phytochimique des plantes

- **Caractérisation des alcaloïdes :**

Réactif de Mayer

Chlorure mercurique.....6.7 g

Iodure de potassium.....25 g

Eau distillée.....200 ml

- **Réactif de Wagner**

Iodure de potassium.....2 g

Iode.....1.27 g

Eau distillée.....100 ml

- **Caractérisation des tanins**

Réactif de Stiasny

Formol à 40%.....10 ml HCl

concentré.....5 ml