

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BILLAMI Chaimaa

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: VALORISATION DES SUBSTANCES NATURELLES VÉGÉTALES

THÈME

Soutenue publiquement le **23/06/2016**

DEVANT LE JURY

Président	Mlle ZERROUKI Kheira	MAA U. Mostaganem
Encadreur	Mr CHAALEL Abdelmalek	MCA U. Mostaganem
Examineurs	Mlle BENZIDANE Dehiba	MAA U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la santé –LMBAFS-

Dédicaces

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 mes chers frères : Mohamed el Amine et Abd el Hakim, pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse.

A Mr Megnafi Hicham docteur à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen qui m'a encouragé à réaliser ce travail.

A mes cousines et cousins : Yousra Billami, Kawthar Billami, Meriem Billami, Leila Billami, Syrinne Billami, Anes Billami, Djamil Billami, Nassima Brahami, Nabila Brahami, Mustapha Brahami.

A mes ami(e)s : Soumia, Abdelkader Baghli, Hamza, M. Belkacem, B. Abdellah, Sidali Haouas, Amina stambouli, Kawter, Amir.

A Hiba et Souhila Hansali qui m'ont aidé au niveau du laboratoire LMBAFS et à ma sœur et amie Khadidja enseignante à l'université de Mostaganem.

A ma grande famille et collègues.

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à Mr CHAALEL Abdelmalek, Maître de conférence à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Mostaganem pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'a accordé m'ont permis de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Melle ZERROUKI Kheira, Maître assistante A à l'Université de Mostaganem pour sa précieuse aide et ses conseils et d'avoir accepté de présider le jury.

J'exprime mes vifs remerciements à Mme BENZIDANE Dehiba, Maître assistante A à l'Université de Mostaganem pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Je tiens à exprimer également ma profonde reconnaissance à Mme BOUAALAM Malika Maître de conférence et responsable du parcours valorisation des substances naturelles végétales à l'université de Mostaganem pour sa contribution à la réalisation de ce travail et ses précieux conseils qu'elle trouve ici mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier le Pr RIAZI Ali directeur du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la santé – LMBAFS- de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer notre mémoire dans son laboratoire.

Résumé

Marrubium vulgare L est une plante médicinale recensée auprès des populations végétales, reconnu par son intérêt thérapeutique, une étude phytochimique a été réalisé afin d'apporter preuves de son efficacité et d'élargir son utilisation dans les domaines chimiques et biologiques pour des fin chimique en médecine, vu son pouvoir antimicrobien et antioxydant. Les analyses effectuées ont permis d'isoler un des principaux métabolites secondaires, les flavonoïdes. L'analyse par CCM a révélé la présence des flavonoïdes dans l'extrait isolé à partir des feuilles. Les tests préliminaires mis en évidence certains métabolites secondaires comme les tanins catéchiques, les saponosides, les anthocyanes, les terpènes et stérols et les flavonoïdes, la teneur de ces derniers est de 8.6% dans l'extrait obtenue a partir des feuilles de la plante étudiée. Les tests de l'activité antibactérienne ont montrés la puissance antibactérienne des flavonoïdes, l'effet bactéricide varie selon la nature de la souche et de la substance testée.

Mots clés : *Marrubium vulgare L*, les flavonoïdes, CCM, pouvoir antimicrobien.

ABSTRACT

Marrubium vulgare is an herbal found among populations, recognized by its therapeutic interest, a phytochemical study was conducted to provide evidence of its effectiveness and to expand its use in the chemical and biological fields for chemical purposes in medicine, regarding to its antimicrobial and antioxidant power. Analyses were used to isolate one of the main secondary metabolites, flavonoids. CCM analysis revealed the presence of flavonoids in extract isolated from the leaves. Preliminary tests showed some secondary metabolites such as catechiques tannins, saponins, anthocyanins, terpenes and sterols and flavonoids, the content of these is about 8.6% in the extract obtained from the leaves of the plant studied. The antibacterial activity tests have shown the antibacterial power of flavonoids, the bactericidal effect varies with the nature of the strain and the substance tested.

Keywords: *Marrubium vulgare*, flavonoids, CCM, antimicrobial power.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Structure des squelettes des polyphénols.	8
2	Différentes structures des flavonoïdes.	10
3	Liste des souches bactériennes étudiées.	55
4	La mise en évidence des métabolites secondaire au niveau des feuilles du <i>Marrubium vulgare</i> .	58
5	Pourcentage de l'extrait brut méthanolique.	59
6	Résultats de la teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait brut méthanolique de <i>Marrubium vulgare</i> .	60
7	Rapports frontaux et couleurs des taches	62
8	Activité antibactérienne de l'extrait flavonoïdique sur milieu Mueller-Hinton (mm).	64

LISTE DE FIGURES

Figure	Titre	page
1	Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate.	7
2	Squelette de base des flavonoïdes.	9
3	Différentes structures des tanins.	13
4	Schéma exemples de structures de monoterpènes acycliques et cycliques rencontrées dans les huiles essentielles.	18
5	Schéma Exemples de structures de sesquiterpènes rencontrées dans les huiles essentielles.	19
6	Schéma Exemples de structures de composés aromatiques rencontrées dans les huiles essentielles.	20
7	Quelques exemples d'appareil sécréteur.	22
8	Principaux produits de glucoserie.	23
9	Origine des terpènes : formation des précurseurs de chaque classe.	24
10	Biosynthèse des terpènes : origine des unités en C5.	25
11	<i>Marrubium vulgare L.</i>	34
12	la plante <i>Marrubium vulgare L.</i>	35
13	Vue générale de la plante de <i>Marrubium vulgare</i> prise à partir du site d'étude.	45
14	Localisation géographique de la zone d'étude (Wilaya de Tlemcen).	46
15	préparation de la gamme d'étalonnage avec de l'acide gallique.	49
16	Evaporation de l'extrait par un évaporateur rotatif.	50
17	Schéma des différentes étapes suivies lors de l'extraction des flavonoïdes.	52
18	Séparation des flavonoïdes sur CCM.	54
19	Etude de l'antagonisme par la méthode de diffusion en puits ADT.	56
20	Exemple de deux tests réalisés sur la mis en évidence des terpènes et stérols et des tanins catéchiques.	59
21	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	60
22	rendement des flavonoïdes des feuilles de <i>Marrubium vulgare</i> .	61
23	résultat de la séparation sur CCM.	62
24	Exemples de l'activité antibactérienne de l'extrait flavonoidique.	64
25	Pouvoir antibactérien de l'extrait flavonoidique.	65

LISTE DES ABREVIATIONS

- Acétyl CoA** : Acétyl coenzyme A.
- AlCl₃** : Chlorure d'aluminium.
- APG** : Angiosperms Phylogeny Group.
- C₂H₅OH** : Ethanol.
- C₄H** : Cinnamate 4-hydroxylase.
- CCM** : Chromatographie sur couche mince.
- CH₃COOH** : Acide acétique.
- CHCl₃** : trichlorométhane (Chloroforme).
- CMB** : Concentration minimale Bactéricide.
- CMI** : Concentration minimale inhibitrice.
- DMAPP** : Diméthylallylpyrophosphate.
- DMAPP** : Pyrophosphate de diméthylallyle.
- FeCl₃** : Chlorure ferrique
- Flv** : Flavonoïdes.
- FPP** : Farnésylpyrophosphate.
- GFPP** : Géranylfarnésyl pyrophosphate.
- GGPP** : Géranylgéranylpyrophosphate.
- GPP** : Géranylpyrophosphate.
- H₂SO₄** : Acide Sulfurique.
- H₃PMO₁₂O₄** : Acide phosphomolybdique.
- H₃PW₁₂O₄O** : Acide phosphotungstique.
- HCl** : Acide chlorhydrique.
- HMG-CoA** : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A.
- IE**: entérocoques endocardite infectieuse.
- IPP** : Isopenténylpyrophosphate.

Mg EAG/ml d'extrait : mg équivalent en acide gallique par ml d'extrait

MH : Muller-Hinton.

MO₈O₃ : Molybdène.

MVA : Acide mévalonique.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

NH₄OH : Ammoniac.

Nm : nanomètre

PAL : Phénylalanine ammonia-lyase

PEB : Poids de l'extrait brut méthanolique (g)

PMV : Poids de matière végétale

R : Rendement

R₂ : Coefficient de corrélation

Rf : rapport frontal

UV : Ultra-Violets.

W₈O₂₃ : Oxydes bleus de tungstène.

TABLE DES MATIERES

Résumé Français

Résumé anglais

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

INTRODUCTION GENARALE..... 1

CHAPITRE I : LES PLANTES MEDICINALES

1. Généralité sur les plantes médicinales.....	3
I. Définition.....	3
I.1. Les plantes spontanées	3
I.2. Les plantes cultivées.....	4
I.3. Efficacité des plantes entières.....	4
I.4. Principes actifs des plantes médicinales.....	5
II. La récolte.....	5
III. La procédure de la cueillette.....	5
IV. Le séchage des plantes.....	5
V. La conservation et le stockage	6
VI. Les métabolites secondaires	6
VI.1. Les polyphénols.....	6
VI.1.1. Biosynthèse.....	7
VI.1.2. Classes des polyphénols.....	7
VI.1.3. Effets biologiques des polyphénols	8
VI.2. Les flavonoïdes	9
VI.2.1. Structure et classification.....	9
VI.2.2. Localisation et distribution	11
VI.2.3. Intérêt et effets biologiques des flavonoïdes.....	11
VI.2.4. Utilisation thérapeutique	12
VI.3. Les tanins.....	12
VI.3.1. Localisation et distribution	13
VI.3.2. Classification.....	13
a. Tanins hydrolysables.....	13
a.1. Tanins gallique (Gallo tanins).....	13
a.2. Tanins ellagiques (Ellagitanins).....	14
b. Tanins condensés.....	14
VI.3.3. Utilisation thérapeutique.....	14
VI.4. Les alcaloïdes.....	14
VI.4.1. Nature et présence des alcaloïdes.....	15
VI.4.2. Propriétés physiques des alcaloïdes.....	15
VI.4.3. Propriétés chimiques des alcaloïdes.....	16
VI.5. Les huiles essentielles.....	16
VI.5.1. Caractéristique physico-chimiques des huiles essentielles.....	16
a. Propriétés physiques.....	16

b. Composition chimique.....	17
b.1. Trapénoïdes.....	18
b.1.1. Les monoterpènes.....	18
b.1.2. Les sesquiterpènes.....	19
VI.5.2. Les composés aromatiques.....	20
VI.5.3. Composés d'origines diverses.....	20
VI.5.4. Répartition et localisations des huiles essentielles.....	20
VI.5.5. Fonction des huiles essentielles.....	22
VI.5.6. Biosynthèse des huiles essentielles.....	22
VI.5.7. Chimiotaxonomie.....	26
VII. La phytothérapie.....	28
VIII. Mode d'emploi des plantes médicinales.....	29
VIII.1. La décoction.....	29
VIII.2. L'infusion.....	29
VIII.3. La macération.....	30
VIII.4. L'extraction des sucs.....	30
VIII.5. Autres modes de préparation.....	31
a. Poudre.....	31
b. Cataplasme.....	31
c. Fumigation.....	31

CHAPITRE II : *MARRUBIUM VULGARE L.*

I. Introduction.....	32
II. Généralité sur la famille des lamiacée.....	32
III. Classification.....	32
III.1. Ancienne Classification.....	33
III.2. Classification selon l'APG (Angiosperm Phylogeny Group).....	33
IV. L'espèce étudiée.....	34
IV.1. Historique.....	34
IV.2. Classification botanique Selon (APG III).....	34
IV.3. Aspect botanique.....	35
IV.4. Aspect phytochimique.....	36
IV.5. Origine.....	36
IV.6. Propriété et utilisation.....	36
IV.6.1. Effets nocifs de la plante.....	37
IV.6.2. Contre-indications et effets indésirables.....	37
IV.7. Composition.....	37
IV.8. Huile essentielles de <i>Marrubium vulgare L.</i>	37
IV.9. Répartition géographique.....	38
IV.10. Utilisation traditionnelle.....	38
IV.11. Toxicité	38

CHAPITRE III : ACTIVITÉ ANTIBACTERIENNE.

I. Introduction.....	39
II. Généralités.....	39
III. Culture des bactéries.....	40
IV. Les antibiotiques.....	40
IV.1. Classification des antibiotiques.....	40

V. Activité antimicrobiennes des métabolites secondaires.....	41
VI. Description des bactéries étudiées.....	42
a. <i>Escherichia coli</i>	42
b. <i>Staphylococcus aureus</i>	42
c. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	42
d. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
e. <i>Micrococcus luteus</i>	43
f. <i>Listeria monocytogenes</i>	44
g. <i>Enterococcus durans</i>	44

CHAPITRE IV : MATERIELS ET METHODES.

I. Matériels utilisés.....	45
I.1. Matériel végétal.....	45
I.1.1. site de prélèvement.....	45
I.1.2. Séchage.....	46
II. Méthodes suivies.....	46
II.1. Tests biochimiques préliminaires.....	46
a. Recherche des saponosides.....	46
b. Recherche des anthocyanes.....	47
c. Recherche des leuco anthocyanes.....	47
d. Recherche des flavonoïdes.....	47
e. Recherche des alcaloïdes.....	47
f. Recherche des terpènes et des stérols.....	48
g. Recherche des cardinolides.....	48
h. Recherche des tanins.....	48
II.1.1. Préparation de l'extrait brut méthanolique.....	48
II.1.2. Dosage des composés phénoliques totaux.....	48
II.2. Extraction des flavonoïdes.....	49
a. Macération.....	49
b. Evaporation.....	50
c. Extraction par solvants.....	50
d. Affrontement à l'éther de pétrole.....	50
e. Affrontement au chloroforme.....	51
II.4. La chromatographie sur couche mince (CCM).....	53
a. Séparation des flavonoïdes par Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	54
III. Activité antibactérienne.....	54
III.1. Matériels et méthodes.....	54
III.1.1. Matériel Utilisé.....	54
a. Extrait de <i>Marrubium vulgare L.</i>	54
b. Souches bactériennes.....	54
III.1.2. Méthodes suivies.....	55
a. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des puits.....	55
b. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	57

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION.

I. Résultats de l'étude phytochimique.....	58
1. Résultats des tests Préliminaire.....	58
2. Rendement de l'extrait brut méthanolique.....	59

3. Teneur des composés phénolique totaux dans l'extrait brut méthanolique.....	60
4. Teneur en flavonoïdes.....	61
5. Chromatographie sur couche mince des flavonoïdes.....	62
II. Résultats de l'activité antibactérienne.....	64
1. activité antibactérienne de l'extrait flavonoïdique.....	64
2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	65

CONCLUSION GENERALE.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

ANNEXES.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les plantes médicinales ont été une source inépuisable de médicaments pour les tradipraticiens pour guérir certaines pathologies souvent mortelles. Les plantes réputées actives ont été recensées pour évaluer leurs propriétés et valider leurs usages dans le domaine d'ethnopharmacologie (recherche de nouvelles molécules). Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmentés significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs (**Pelt, 2001**). Jusqu'à présent, sur les 300000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques (**Verpoorte, 2002**), ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré.

Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source de chimiodiversité avec des structures très originales souvent utilisées en industrie comme produits naturels (les extraits actifs d'origine végétales). Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants tels que les flavonoïdes qui sont utilisés dans le domaine pharmaceutique, cosmétique, alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé. Les flavonoïdes sont reconnus essentiellement pour leur action antioxydante, modulatrice de l'activité de certaines enzymes, vasculoprotectrice (**Vitor et al., 2004**), anti-inflammatoire (**Chen et al., 2008**) et antidiabétique (**Marfak, 2003**). L'intérêt accru des antioxydants d'origine naturelle dans le but d'augmenter la conservation des aliments s'explique par le fait que certains antioxydants synthétiques présentent des risques de cancérogénicité.

L'Algérie, pays connu par ces ressources naturelles dispose d'une flore riche et varié. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques (**Gaussen, 1982**). La recherche de molécules bioactives d'origine naturelle constitue d'ailleurs un des axes prioritaires de l'industrie pharmaceutique algérienne mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle.

Notre choix s'est porté sur le Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* qui est une source très riche en tanins et flavonoïdes que l'on rencontre dans les feuilles. Elle est largement utilisée dans le bassin méditerranéen pour ses nombreuses vertus thérapeutiques (contre le diabète, les infections des voies respiratoires et les troubles de la sécrétion biliaire, les

affections bronchiques, les études en cours sur l'effet de Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* sur d'autres maladies.

Ainsi donc, ses effets sur les diverses pathologies nous ont poussés à valoriser cette espèce endémique végétale qu'est le Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* et à démontrer les activités biologiques de ses principes actifs. Notre travail s'articule sur cinq chapitres :

- ✓ Le premier chapitre généralité sur les plantes médicinales et les différentes méthodes d'extraction de molécules actives.
- ✓ Le deuxième chapitre est consacré à une étude détaillée sur le Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L, ses composants, et ses différentes utilisations.
- ✓ Le troisième chapitre définit l'effet des métabolites secondaires sur des souches bactériennes pathogène responsable de plusieurs maladies.
- ✓ Le quatrième chapitre englobe le mode opératoire réalisé au laboratoire ; une étude phytochimique détaillée de la plante se basant notamment sur l'isolement d'un des composés polyphénoliques majeurs existant au niveau des feuilles et une étude sur le pouvoir antibactérien de l'extrait flavonoïdique.
- ✓ Le cinquième chapitre regroupe les résultats obtenus et leurs interprétations.

CHAPITRE I

Les plantes medicinales

1. Généralité sur les plantes médicinales

L'Algérie, pays connu pour sa biodiversité, dispose d'une flore particulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques. Ce potentiel floristique constitué de plantes médicinales, toxiques et condimentaires, est peu exploré du point de vue chimique et pharmacologique. A cet effet, il constitue à notre avis, une source non négligeable de recherche de substances naturelles (Quezel, 1963).

La médication par les plantes ou phytothérapie, était d'usage courant dans les plus anciennes civilisations qui s'intéressaient aux vertus curatives de certains végétaux. On peut dire qu'il s'agit d'une des premières manifestations de l'effort immémorial de l'homme pour comprendre et utiliser la nature (Bossardet et Rivolier, 1977).

I. Définition

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Farnsworth *et al.*, 1986). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Elqaj *et al.*, 2007).

Les plantes médicinales portent à la fois sur les plantes spontanées dites « sauvages » ou « de cueillette » et sur les plantes cultivées.

I. 1. Les plantes spontanées

Ce sont des plantes difficiles ou impossibles de les cultiver. Elles représentent encore, d'après certaines firmes importatrices, 60 à 70% des drogues du marché Européen. Quant à la valeur médicinale des plantes spontanées, elle se montre très inégale puis qu'elle varie suivant l'origine ; le terrain et les conditions de croissance.

I. 2. Les plantes cultivées

La culture des plantes évite ces inconvénients. Elle assure une matière première en quantité suffisante, homogène au double point de vue aspect et composition chimique. Elle peut être intensifiée ou non suivant les besoins médicaux.

Naturellement, la culture doit d'effectuer dans les meilleures conditions possibles et tenir compte, entre autres, des races chimiques (**Benzanger- Beauquesne *et al.*, 1975**).

I. 3. Efficacité des plantes entières

S'il est capital de maîtriser l'action des différents principes actifs pris isolément, la phytothérapie, à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi «totum» plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Etudier les pièces d'une montre et réussir à en identifier les parties essentielles ne permet pas de comprendre comment elle fonctionne, de même que disséquer une plante médicinale pour isoler ses principes actifs ne suffit pas pour expliquer comment elle agit. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants. Ainsi, des chercheurs ont démontré que les principes actifs de nombreux végétaux, agissent de manière complexe et combinée pour produire un effet thérapeutique global. Les plantes contiennent des centaines, voire des milliers de substances chimiques actives (**Iserin, 2001**).

Souvent, déterminer en détail l'action d'une plante est très difficile, sinon impossible - même si son effet médical est, en revanche, bien connu. L'étude pharmacologique des plantes entières indique qu'elles fonctionnent comme un puzzle incomplet. En outre, bien qu'il soit utile de connaître les principes actifs d'une plante, cette information peut être trompeuse. Irritante des dérivés anthracéniques sur la paroi intestinale stimule les selles, est fréquemment employée comme purgatif (**Iserin, 2001**).

Mais elle n'est efficace qu'à hautes doses. A petites doses, d'autres de ses constituants comme les tanins ont un effet plutôt astringent sur les muqueuses intestinales. La rhubarbe de Chine produit donc des effets contradictoires selon la quantité absorbée : elle est laxative à des doses modérées ou importantes, antidiarrhéique à de faibles doses. Cet exemple démontre que l'expérience du praticien combinée à celle du patient est souvent le guide le plus sûr pour connaître l'effet thérapeutique des plantes entières ; ensuite, que la valeur d'une plante médicinale ne peut être limitée à la liste de ses principes actifs (**Iserin, 2001**).

I. 4. Principes actifs des plantes médicinales

Le métabolisme de la plante verte produit avant tous des glucides (sucres) et des protides. Une fraction des glucides est ensuite transformée en composés divers dont les lipides sont les plus importants pour la plante, mais le métabolisme fournit aussi plusieurs corps secondaires que l'homme utilise dans son arsenal thérapeutique, il s'agit des alcaloïdes, des hétérosides, des huiles essentielles et des tanins, les végétaux nous fournissent également des vitamines, des oligoéléments, et des antibiotiques (champignons microscopique) (**Boiteau et Potier, 1980**).

II. La récolte

L'efficacité d'une plante dépend nécessairement de sa récolte (au moment opportun et en place saine) et de sa conservation (dans un lieu sec, à l'abri de la poussière et de la lumière) (**Baba Aissa, 1999**). Ainsi, le choix du moment de la cueillette dépend du rythme naturel de la vie végétale. Le moment optimal varie, évidemment, selon les espèces de plantes, mais il dépend aussi de la partie de la plante à récolter. En plus, il est toujours préférable de procéder à la récolte par un temps sec et chaud : les plantes mouillées de pluie ou de rosée s'altèrent, moisissent, fermentent, et perdent, de toute façon, toute valeur thérapeutique. Le matin est le moment le plus favorable mais on peut toutefois cueillir aussi le soir, avant la fraîcheur (**Debuigue, 1984**).

III. La procédure de la cueillette

Les conditions de culture, de récolte, de séchage et de stockage ont une action déterminante sur la qualité des drogues végétales. Ainsi, il vaut mieux cueillir les plantes dans un lieu peu fréquenté car les plantes destinées à être séchées, ne doivent en aucun cas être lavées. Donc, elles doivent être exemptes d'impuretés telles que terre, poussières, souillure, ainsi que d'infections ou de contamination animale. Elles ne présentent aucun signe de pourriture ou d'endommagement (**Wichtel et anton, 1999**).

IV. Le séchage des plantes

L'opération de séchage a pour but d'enlever aux plantes l'eau qu'elles renferment, pour assurer une bonne conservation, afin de favoriser l'inhibition de toute activité enzymatique, éviter la dégradation de certains constituants ainsi que la prolifération bactérienne (**Wichtel et Anton, 1999**).

L'idéal serait de faire sécher les plantes à l'ombre par temps chaud, dans un endroit vaste et bien ventilé (**Debuigue, 1984**).

V. La conservation et le stockage

Il est préférable d'imposer une protection vis-à-vis de la lumière à toutes les plantes, car les feuilles, fleurs, etc..., se décolorent rapidement à la lumière, d'où une détérioration de leur aspect. En effet, la luminosité peut accélérer de nombreux processus chimiques, et entraîner une dégradation ou une modification des constituants présents. La température constitue un autre paramètre important et il est admis qu'une élévation de température de 10°C double la vitesse de dégradation. Donc, il est préférable de stocker les plantes dans un endroit bénéficiant d'une température et d'une humidité relative constantes (**Wichtel et Anton, 1999**).

VI. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (**Lutge et al., 2002, Abderrazak et JOËL, 2007**).

VII. 1. Les polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (**Bruneton, 1999 ; Lugasi et al., 2003**).

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (**Lugazi et al., 2003**).

Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (**King et Young, 1999 ; Tapiero et al., 2002**). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**).

VI. 1. 1. Biosynthèse

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique (Figure 1). Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines (**Figure 01**) (**Bruneton, 1993**).

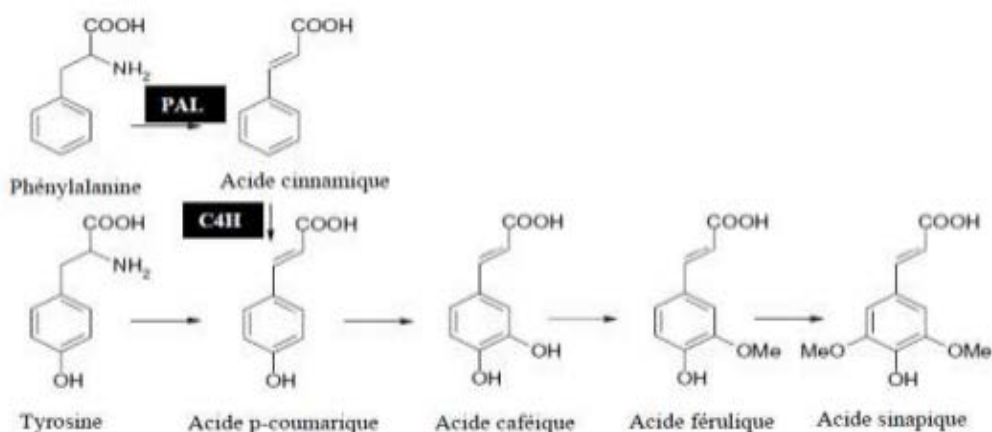

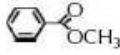

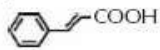
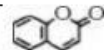

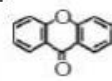
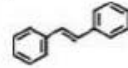
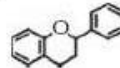


Figure 1 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (**Crozier et al., 2006**). PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase.

VI. 1. 2. Classes des polyphénols

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (**Tableau 1**). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

Tableau 1 : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre de Carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de Base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénonnes	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphényl acétique	
9	C6-C3	Acides hydroxycinamiques	Acide Coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiférine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

VI. 1. 3. Effets biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Bahorun, 1997).

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux, anti-allergènes, vasodilatateurs et antioxydants (Falleh *et al.*, 2008).

Les composés polyphénolique sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique. Ils sont regroupés dans la catégorie des veinotoniques et des vasculoprotecteurs. Parmi les veinotoniques, nous citerons le Relvenet ou le Cirkant renfermant du ruténoside, le Daflont ou le Diosmilt renfermant de la diosmine. Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont

également en étude clinique comme des antiagrégants plaquettaire, ou hypotenseur sans résultats probants (Martin et Andriantsitohania, 2002).

VI. 2. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum *et al.*, 2006), 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 (Bruneton, 1999; Ghestem *et al.*, 2001).

Du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées (Harborne et Williams, 2000).

VI. 2. 1. Structure et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- γ -pyranne (Skerget *et al.*, 2005). Leur structure de base est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (Tableau 02, Figure 02) (Dacosta, 2003).

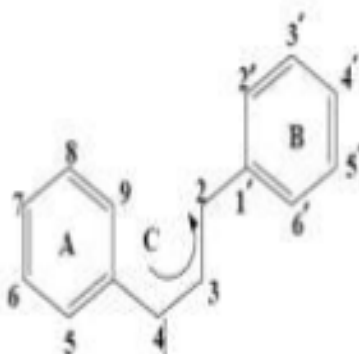
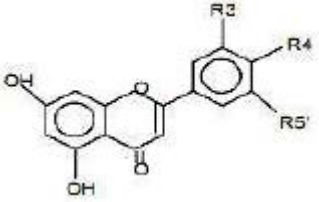
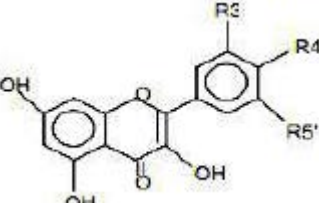
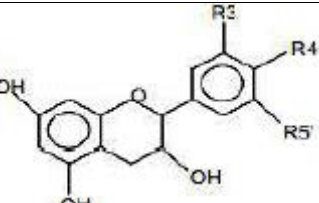
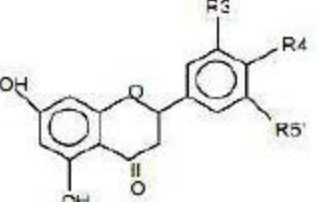
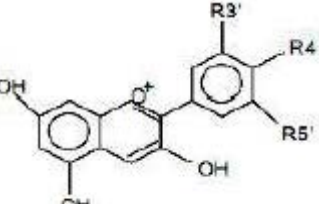
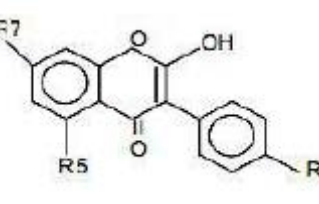


Figure 2 : Squelette de base des flavonoïdes (Chebrouk, 2009).

De façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (Dacosta, 2003).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, aurones, chalcones, anthocyanins (Efendi *et al.*, 2008).

Tableau 2 : Différentes structures des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavanols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavonones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanins		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
isoflavandiols		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzeine

VI. 2.2. 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 (**Bruneton, 1999**).

VI. 2. 3. Intérêts et effets biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois... (**Bruneton, 1999**) Chapitre I Généralités sur les plantes médicinales 9 Certains flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus. Les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles (**Grace et al., 1996**).

Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs (**Decooma et al., 1993**). Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances jaunes et orangées). Leur fonction principale est la pigmentation des plantes (aspect esthétique). Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de Co-pigments (certaines flavones et flavonols) (**Grace et al., 1996**) (**Bruneton, 1999**).

Les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune-orangé au bleu, en passant par le pourpre et le rouge (**Grace et al., 1996**) (**Luigia et Giuseppe, 2006**) . Les flavones, auronnes et chalcones donnent plutôt des couleurs jaune, beiges voire blanche, ou participent aux nuances produites par les anthocyanes et les caroténoïdes (**Bruneton, 1999**).

Un des rôles de la couleur chez les plantes est d'attirer les insectes et les oiseaux, qui jouent un rôle majeur dans la pollinisation et la dispersion assurant ainsi la reproduction de l'espèce (**Bruneton, 1999**).

Les flavonoïdes, dissous dans les vacuoles à l'état d'hétérosides, s'accumulent dans les cellules épidermiques, assurant la protection des tissus contre les rayonnements solaires nocifs

(Crozier *et al.*, 1997 ; Stobieck *et al.*, 2006). On prête à certains flavonoïdes (phytoalexines), un rôle de défense contre les prédateurs et les pathogènes (Pengelly, 1996; Stobieck *et al.*, 2006).

VI. 2. 4. Utilisation thérapeutique

Par-delà les résultats partiels fournis par des tests biochimiques ou des études de pharmacologie animale, la réalité de l'efficacité clinique de la plupart des flavonoïdes et, a fortiori, celle des drogues qui en contiennent est rarement correctement établie. Les essais chez l'homme ne sont assez souvent que des observations et ne sont pas toujours conduits en conformité avec les normes actuellement en vigueur pour un type d'évaluation.

C'est essentiellement dans le domaine capillaro-veineux que l'on utilise les flavonoïdes ; seuls ou associés, ce sont les constituants habituels des vasculo-protecteurs et veinotoniques et des toniques utilisés en phlébologie. La plupart des spécialités actuellement disponibles ont des indications ou propositions d'emploi suivantes :

- Traitement des symptômes en rapport avec l'insuffisance veinolymphatique (jambes lourdes, douleurs, impatiences des primo-décubitus).
- Traitement des signes fonctionnels liés à la crise hémorroïdaire.

Quelques spécialités revendiquent en plus d'autres indications ou propositions d'emplois :

- Amélioration des troubles de la fragilité capillaire au niveau de la peau.
- Traitements des métrorragies lors de la contraception par microprogestatifs et des métrorragies dues au port du stérilet.
- Proposé dans les troubles impliquant la circulation rétinienne et/ou choroïdienne.
- Traitement du lymphoedème du membre supérieur après traitement radio-chirurgical du cancer du sein (Bruneton, 1999).

VI. 3. Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénolique de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est lié à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da (Figure 03) (Paris et Hurabielle, 1981).

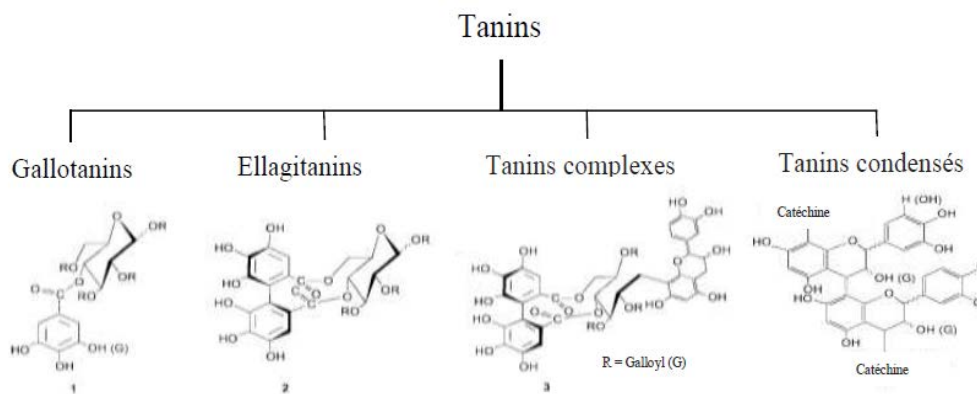


Figure 3 : Différentes structures des tanins (**Karamali et Teunis, 2001**).

Caractérisées par leur astringence, ils ont la propriété de précipiter les protéines (fongiques ou virales) et les métaux lourds. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides (**Kansole, 2009**).

VI. 3.1. Localisation et distribution

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacées, les rosacées (**Ghesterm et al., 2001**). Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines (**Khanbabae et Ree, 2001**).

VI. 3. 2. Classification

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique: Les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Bruneton, 1999**).

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 (**Paris et Hurabielle, 1981**).

a. 1. Tanins galliques (Gallo tanins)

Ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.

a. 2. Tanins ellagiques (Ellagitanins)

Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique (**Paris et Hurabielle, 1981**).

b. Tanins condensés

Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3 ols, le plus souvent épicatechine et catéchine (**Khanbabaea et Ree, 2001**). Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (**Paris et Hurabielle, 1981**).

VI. 3. 3. Utilisation thérapeutique

Les drogues à tanins servent surtout en thérapeutique pour leurs propriétés astringentes à l'extérieur et antidiarrhéiques en usage interne, Sur la peau et les muqueuses. Il s'ajoute une action vaso-constrictrice des petits vaisseaux, d'où l'emploi contre les hémorroïdes, les blessures superficielles. Les extraits tanniques sont aussi anti-inflammatoires dans les brûlures. Les drogues à tanins sont employées contre les diarrhées (Ratanhia, Salicaire). À l'action ralentissante du péristaltisme intestinal, s'ajoute l'action antiseptique ; les tanins libres étant détruits rapidement par le suc intestinal alcalin. On emploie de préférence les combinaisons tanniques et mieux les extrais végétaux complexes qui libèrent graduellement leurs tanins au cours de la digestion.

Il a été constaté que certains extraits tanniques comme ceux des *Acer* inhibaient la croissance de champignons, de bactéries, de virus. Ceci justifie l'emploi de drogues à tanins comme antiseptiques notamment dans les maladies pulmonaires (**Paris et Moyse, 1976**).

VI. 4. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine (**Guignard, 2000**). Ce sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques ou amers et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques (**Dellile, 2007**). Ils ont des structures très diverses et dérivent de différents acides aminés ou de l'acide mévalonique en passant par différentes voies biosynthétiques (**Judd et al., 2002**). De nombreux poisons dangereux comme l'atropine par exemple, sont extraite de la belladone mortellement toxique (*Atropa belladonna*) et qui peut cependant être utilisée à faible dose dans une optique thérapeutique. Les alcaloïdes sont utilisées comme anti cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (**Iserin et al., 2007**).

VI. 4. 1. Nature et présence des alcaloïdes

La source principale des alcaloïdes était auparavant les plantes florales mais plusieurs composés de cette famille ont été récemment extraient des règnes animaux à savoir les insectes et les poissons. Malgré cet avancement, les alcaloïdes floraux restent les plus importantes par rapport aux restes (**Kirrmann *et al.*, 1975 ; Bruneton, 1993**). En général les alcaloïdes ne se concentrent pas dans une seule partie de la plante.

Ils se présentent avec des concentrations différentes dans les tiges, les fleurs, les racines et les feuilles. Cette même concentration se diffère selon la période de récolte. Signalons que la présence des alcaloïdes dans une partie de la plantes ne prouve en aucun cas sa naissance dans ce milieu.

La présence des alcaloïdes est généralement associée à un acide organique ou à une autre entité avec un pourcentage variant entre 1 et 3 % du poids sec de la plante. Dans des cas très particuliers, notamment dans les quinquinas, ils dépassent les 10 % (**Vallet, 1996 ; Alhidan, 1998; Bruneton, 1999**).

Le rôle des alcaloïdes dans la plante reste encore moins clair. Probablement ils sont considérés comme une réserve d'azote en cas de son manque dans le sol.

VI. 4. 2. Propriétés physiques des alcaloïdes

La masse moléculaire des alcaloïdes varie entre 100 et 900 g/mol. Les alcaloïdes et leurs sels purs sont en général des produits solides cristallisés caractérisés par un point d'ébullition propre. Certains alcaloïdes sont amorphes se trouvant sous forme de cires. D'autres alcaloïdes de faibles points d'ébullitions sont à l'état liquide sous forme d'huiles dont la viscosité variante (**Paris et Hurabielle, 1986**).

Les alcaloïdes dans le cas général sont des produits incolores, sans odeurs spécifique, particulièrement ceux qui ayant de faible points d'ébullition. Un nombre limité des alcaloïdes possédant des cycles aromatiques vire vers le jaune tel que la berbérine et la colchicine, d'autres virent vers l'orange à l'image de la canadine (**Paris et Hurabielle, 1986**).

Les alcaloïdes liquides peuvent être volatils caractérisés par une odeur spécifique ou non volatils. Signalons enfin que les alcaloïdes ont un gout amer (**Cordelle, 1949; Paris et Hurabielle, 1986**).

VI. 4. 3. Propriétés chimiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes peuvent former des sels organiques ou non organiques par action des acides. Ces sels formés sont en général plus stable que les bases mères. Plusieurs alcaloïdes ont une activité optique très importante avec la présence d'un atome de carbone asymétrique (**Bruneton, 1999**).

VI. 5. Les huiles essentielles

Chaque fois que, après avoir écrasé un pétale de fleur, une feuille, une branchette, ou une quelconque partie d'une plante, un parfum se dégage, cela signifie qu'une huile essentielle s'est libérée.

Les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal : elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air. (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

Il est important de distinguer entre les huiles essentielles, les huiles fixes (huile d'olive...) et les graisses contenues dans les végétaux. En effet :

- Seules les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes et des graisses.
- Elles se distinguent des huiles fixes par leurs compositions chimiques et leurs caractéristiques physiques.
- Elles sont fréquemment associées à d'autres substances comme les gommes et les résines.

D'ailleurs elles tendent elles-mêmes à se résinifier par exposition à l'air (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

VI.5.1. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

a. Propriétés physiques

Selon (**Bardeau, 1976 ; Legrand, 1978 ; Lemberg, 1982 ; Bruneton, 1999**), les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques :

- Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques, et peu solubles dans l'eau à laquelle, toutefois, elles communiquent leur odeur.
- Leur point d'ébullition varie de 160° à 240°C.
- Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0,75 à 0,99 (les huiles essentielles de sassafras, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions).
- Elles ont un indice de réfraction élevé.
- Elles sont dextrogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée.
- Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels.
- Ce sont des parfums, et sont de conservation limitée.
- Sont très altérables et sensibles à l'oxydation (mais ne rancissent pas).
- Ce sont des substances de croissance huileuse, plus ou moins fluides, voire résinoïdes, très odorantes et volatiles.
- A température ambiante, elles sont généralement liquides, incolores ou jaunes pâles, il existe, cependant, quelques exceptions, exemple : huiles essentielles à azulène de coloration bleue.
- Ce sont des produits stimulants, employés à l'intérieur, comme à l'extérieur du corps, quelquefois purs, généralement en dissolution dans l'alcool ou un solvant adapté.

b. Composition chimique

La détermination de la composition chimique a intéressée de nombreux chercheurs et les méthodes d'analyse chimique de plus en plus sophistiquées ont permis d'identifier un très grand nombre de constituants des huiles essentielles (**Bruneton, 1999**).

Les huiles essentielles sont des mélanges plus ou moins complexes dont les constituants jouent du point de vue parfum des rôles d'inégale importance : les uns contribuent puissamment à l'arôme de l'essence, certains participent simplement à l'harmonie du mélange. D'autres sont complètement inodores ou peu odorants, ceux-ci ont un rôle tout à fait effacé (**Bruneton, 1999**).

Les constituants des huiles essentielles appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquent, d'autre part. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

b.1. Terpénoïdes

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils : mono- et sesquiterpènes.

b.1.1. Les monoterpènes

Constituants les plus simples de la série, les monoterpènes sont issus du couplage de deux unités « isopréniques ». Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocimène), monocycliques (α et γ -terpinène, p-cymène) ou bicycliques (pinène, camphène, sabinène). Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielles (citrus...) (Voir schéma 1). Les variations structurales justifient l'existence de nombreuses molécules ; alcools (géraniol, α -terpinéol, bornéol trans-trans-farnésol), phénols (thymol), aldéhydes (citronellel), cétoes (carvones, β -vetivone), esters (Acétate de cédryle), éthers (1,8-cinéole) (**Figure 4**) (**Bruneton, 1999**).

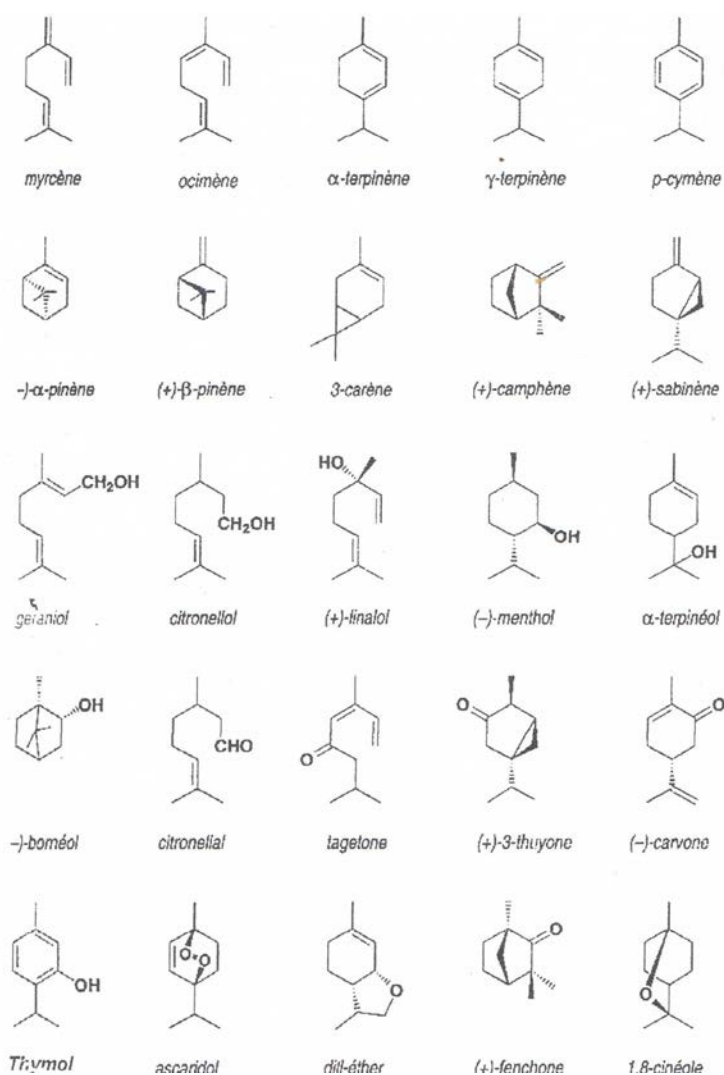


Figure 4 : Schéma exemples de structures de monoterpènes acycliques et cycliques rencontrés dans les huiles essentielles (**Bruneton, 1999**).

b.1.2. Les sesquiterpènes

Un grand nombre de sesquiterpènes (**Figure 5**) sont des constituants habituels des huiles essentielles des végétaux supérieurs, ils peuvent intervenir dans les propriétés pharmacologiques attribuées à ces fractions volatiles.

Biologiquement, bon nombre de structures sesquiterpéniques sont des phytolexines, d'autres semblent agir comme des régulateurs de croissance, d'autres enfin attirent les insectes ou agissent à l'encontre de ceux-ci comme des facteurs antinutritifs (**Bruneton, 1999**).

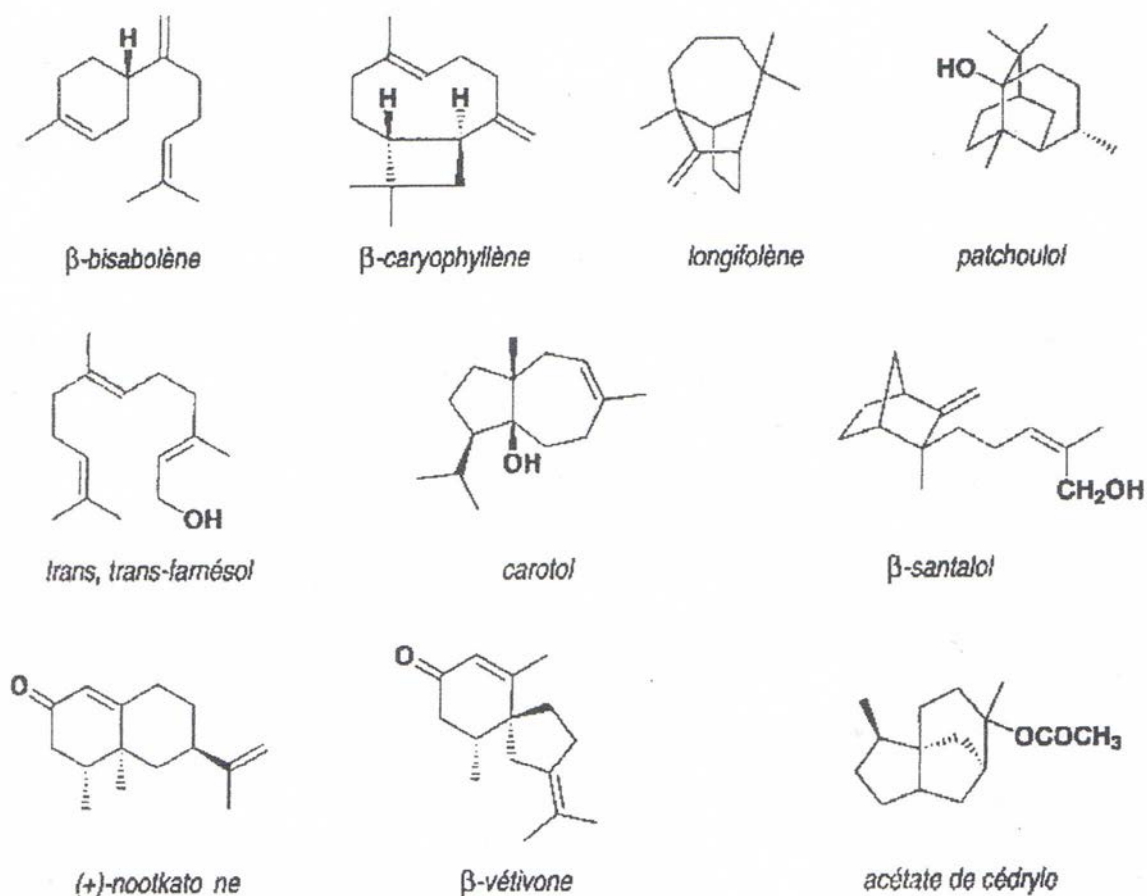


Figure 5: Schéma Exemples de structures de sesquiterpènes rencontrées dans les huiles essentielles (**Bruneton, 1999**).

VI.5.2. Les composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Ce sont très souvent des allyles- et des propénylphénols, parfois des aldéhydes. On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en (C_6-C_1) comme la vanilline ou comme l'anthranilate de méthyle (**Figure 6**).

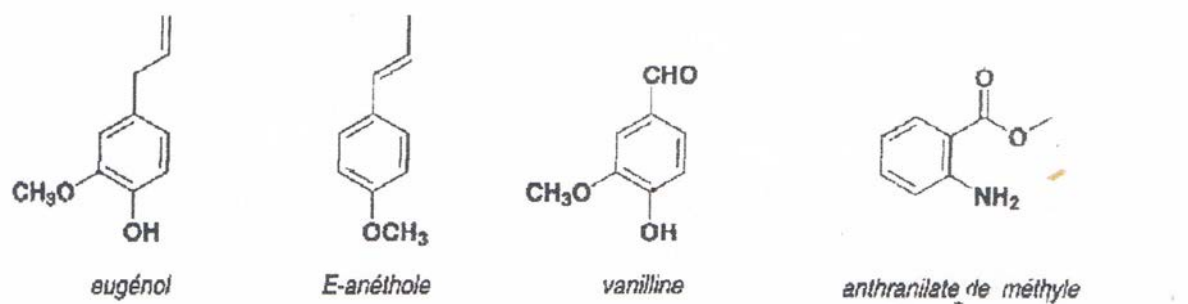


Figure 6: Schéma Exemples de structures de composés aromatiques rencontrés dans les huiles essentielles (**Bruneton, 1999**).

VI.5.3. Composés d'origines diverses

Lors de la préparation des huiles essentielles, certains composés aliphatiques, de faible masse moléculaire, sont entraînés lors de l'hydrodistillation (carbures, acides, alcools, aldéhydes, esters...) (**Bruneton, 1993**).

Les différents composés sont assez stables aux températures ambiantes.

VI.5.4. Répartition et localisations des huiles essentielles

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs : il y a environ 500 000 plants sur terre ; 10000 d'entre elles, environ, possèdent des propriétés médicinales (**Encyclopédie, 2001**).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs (bergamotier, tubéreuse), mais aussi les feuilles (citronnelle, eucalyptus...) et bien que cela soit moins habituel, dans les écorces (cannelier), des bois (bois de rose...), des racines (vétiver), des rhizomes (gingembre), des fruits (anis, badiane), des graines (muscade).

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon la localisation. Ainsi dans le cas de l'oranger amer (*C. aurantium* L. subsp. *aurantium*, Rutacées), le « zeste », c'est-à-dire le péricarpe frais

du fruit, fournit l'huile essentielle d'orange amère ou « essence de Curaçao », la fleur fournit « l'essence de Néroli » et l'hydrodistillation de la feuille, des ramilles et des petits fruits conduit à « l'essence de petit grain bigaradier ». La composition de ces trois huiles essentielles est différente (**Bruneton, 1999**).

Chez les plantes médicinales et aromatiques, à l'exception de leurs racines, tout l'appareil aérien (tige, pétiole, feuilles et fleurs) présentent des formations glandulaires très développées, mais il ressort que la plus grande densité du système glandulaire est relevée sur le limbe foliaire, dont il convient de noter que les huiles essentielles sont élaborées au sein du cytoplasme de certaines cellules ; elles s'en séparent par synérèse, sous forme de petites gouttelettes qui confluent ensuite en plages plus ou moins étendues. Par suite elles sont accumulées, sous la cuticule dans les poils glandulaires sécréteurs situés au niveau des deux épidermes de la feuille et sur les tiges pendant la longue période allant de l'épanouissement des feuilles hors du bourgeon au stade de feuilles adultes. De là, remarque le rôle important de la cuticule dans le stockage des huiles essentielles (**Perrin et Colsan, 1983**).

Chez les ombellifères, racine, tige et feuilles sont parcourues par des canaux sécréteurs qui contiennent un mélange d'essence et de résine. Ils sont surtout abondants dans les tiges, ou l'en trouve en particulier un canal au niveau de chacune des cannelures. Ces canaux expliquent l'odeur forte qui se dégage des ombellifères lorsqu'on les écrase (**Guignard ; 1996**).

Les canaux sécréteurs sont des poches sécrétrices très allongées. Ces canaux sont protégés par une assise de tissus de soutien. En coupe transversale, le canal ressemble à une poche sécrétrice de faible diamètre entourée de 2 assises de cellules (**Demalsy-Feller, 1990**).

Selon **Belaiche (1979)**, la morphologie des formations glandulaires permet de distinguer différents types d'éléments sécréteurs :

- Des cellules sécrétrices (**schéma 2, figure 7**), incluses dans l'épiderme ou à l'extrémité des poils.
- Des poches sécrétrices (**schéma 1, figure 7**), formées par des cellules qui se sont modifiées.
- Des canaux sécréteurs, obtenus par l'allongement des poches sécrétrices.
- Des poils sécréteurs (**schéma 3 et 4, figure 7**).

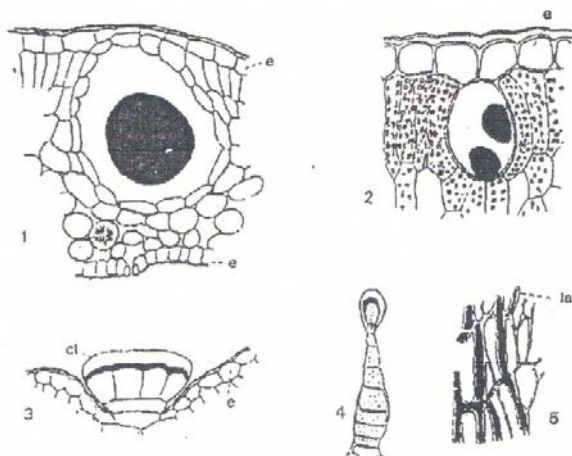


Figure 7 : Quelques exemples d'appareil sécréteur.

1. Poche sécrétrice dans une feuille d'*Eucalyptus globulus* (Myrtacées).
2. Cellule isolée située sous l'épiderme de la feuille de *Sassafras officinale* (Lauracées).
3. Poil de Menthe poivrée (*Mentha piperita*, Lamiacées) : l'essence (en noir) s'accumule sous la cuticule et, trais épaisse.
4. Poil de Patchouli (*Pogostemon*, Lamiacées).
5. Laticifères, lat, dans la racine d'un Salsifis (Astéracées).

VI.5.5. Fonction des huiles essentielles

Le rôle des huiles essentielles n'a pas pu être clairement démontré. En effet, on considère qu'il s'agit de produits de déchets du métabolisme. Toutefois, certains auteurs pensent que la plante utilise son huile essentielle pour repousser les insectes, ou au contraire pour les attirer et favoriser la pollinisation.

D'autres, la considère comme une ressource énergétique, facilitant certaines réactions chimiques. D'autre part, celles conservent l'humidité nécessaire à la vie des plantes exposées à des climats désertiques (Balaiche, 1979).

VI.5.6. Biosynthèse des huiles essentielles

On a longtemps pensé que les terpènes considérés comme des produits ultimes du métabolisme, s'accumulaient dans les tissus spécialisés : glandes poils ...et n'étaient pas repris par le métabolisme de la plante. Mais, des expériences menées sur différentes espèces et dans des conditions variées ont pu établir que ces composés participent activement au métabolisme sans pour autant conclure au rôle qu'ils pouvaient jouer. Cependant, le catabolisme des essences aurait lieu pendant la période de déficience en produits issus de la photosynthèse (Croteau et Loomis, 1973).

Elaborés à partir des mêmes précurseurs, les terpénoïdes et les stéroïdes constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaire des végétaux (**Figure 8**) (Bruneton, 1993).

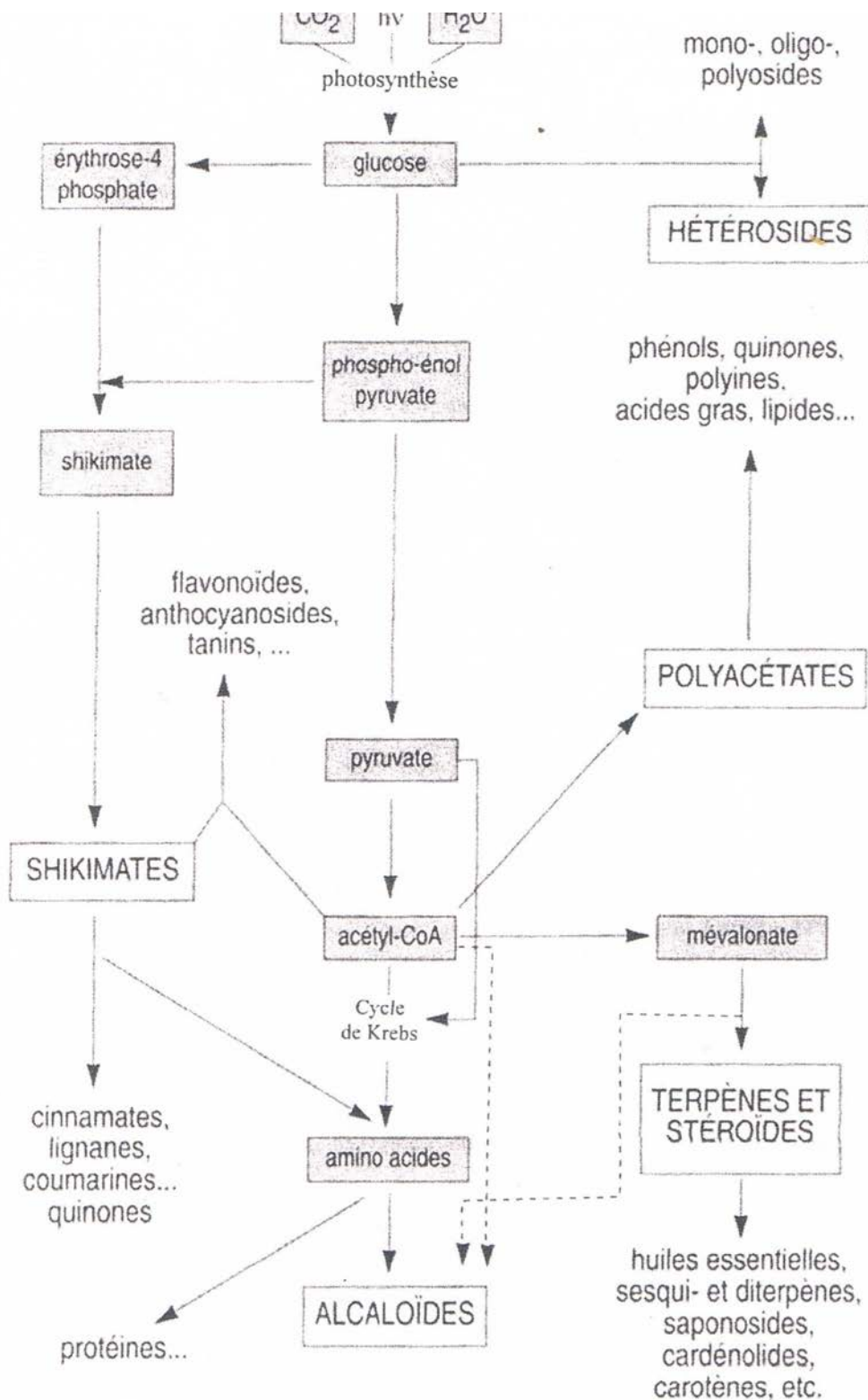


Figure 8: Principaux produits de glucoserie (Bruneton, 1999).

Selon les chercheurs, tous les terpénoïdes sont construits à partir d'unités isopréniques. Toutefois, l'isoprène n'a jamais été trouvé libre dans la nature. Par contre, on a trouvé dans les tissus vivants, un intermédiaire : l'acide mévalonique (**Brun, 1987**).

Les précurseurs des principales classes de terpènes, formées par des réactions enzymo-catalysées, sont des esters pyrophosphoriques d'alcools en $(C_5)_n$ formés par l'addition séquentielle d'une unité en C_5 , le pyrophosphate d'isopentenyle (IPP) sur une molécule starter, un pyrophosphate de prénylallylique, le premier terme de la série étant le pyrophosphate de diméthylallyle (DMAPP) (**Figure 9**) (**Bruneton, 1999**).

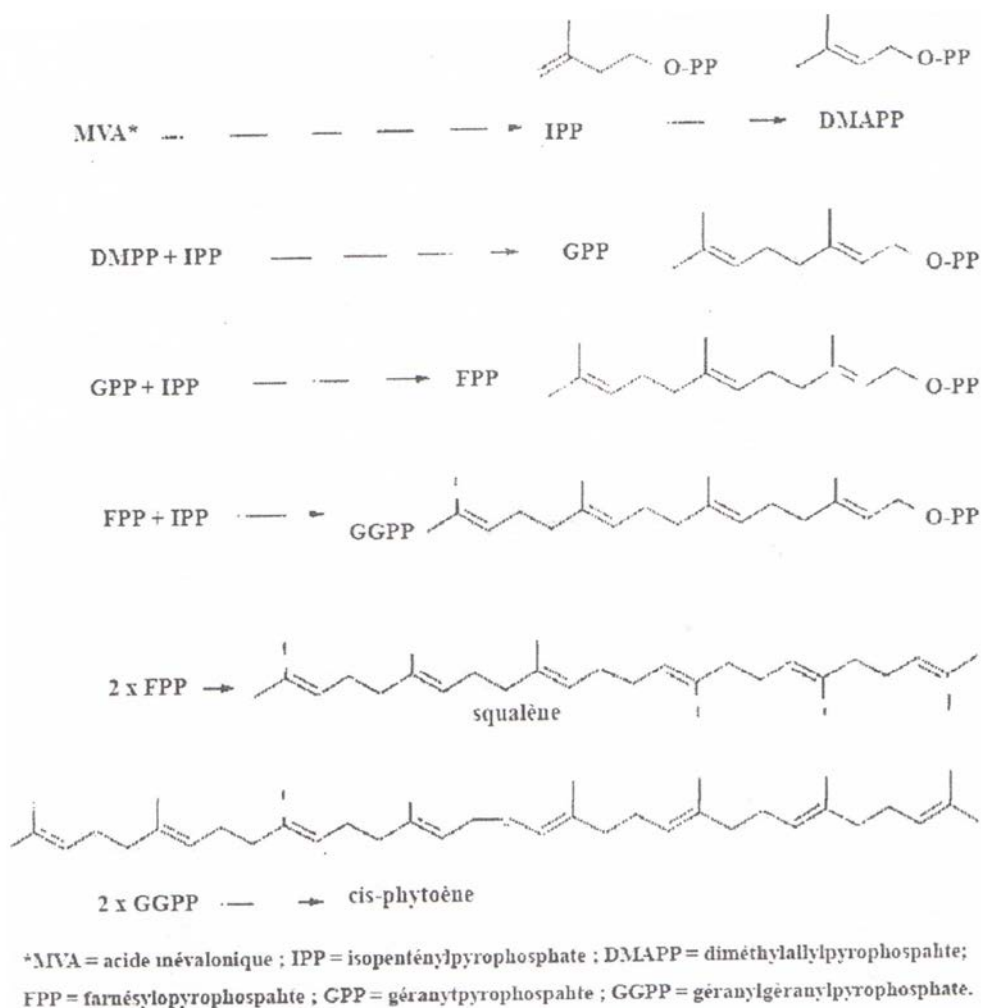


Figure 9 : Origine des terpènes : formation des précurseurs de chaque classe. (**Bruneton, 1999**).

- Géranyl pyrophosphate (GPP), précurseur des monoterpènes en C_{10} .
- Farnésyl pyrophosphate (FPP), précurseur des sesquiterpènes en C_{15} .

- Géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), précurseur des diterpènes en C₂₀.
- Géranylfarnésyl pyrophosphate (GFPP), précurseur des sesterpènes en C₂₅.
- La formation de triterpènes en C₃₀ (et indirectement et stéroïdes) et des carotènes en C₄₀ n'échappe pas complètement à la règle : ils proviennent du squalène et du phytoène, deux carbures respectivement issus du couplage réductif de deux unités de FPP (2×C₁₅=C₃₀) et de deux unités de GGPP (2×C₂₀=C₄₀).
- Dans le cas des polyprénols (caoutchouc et composés voisins) l'addition des unités en C₅ se poursuit un grand nombre de fois.

Les trois séquences réactionnelles fondamentales qui justifient l'existence de tous les terpènes et stéroïdes sont :

- Formation des unités réactives en C₅ à partir de l'acétate, via le mévalonate.
- Couplage tête-à-queue de unités isopréniques impliquées dans la formation des
- mono, sesqui, di, sester, et polyterpènes.
- Couplage queue à queue des unités en C₁₅ et C₂₀ permettant l'élaboration des précurseurs des triterpènes (squalène) et des carotènes (phytoène) (**Figure 10**) (**Bruneton, 1993**).

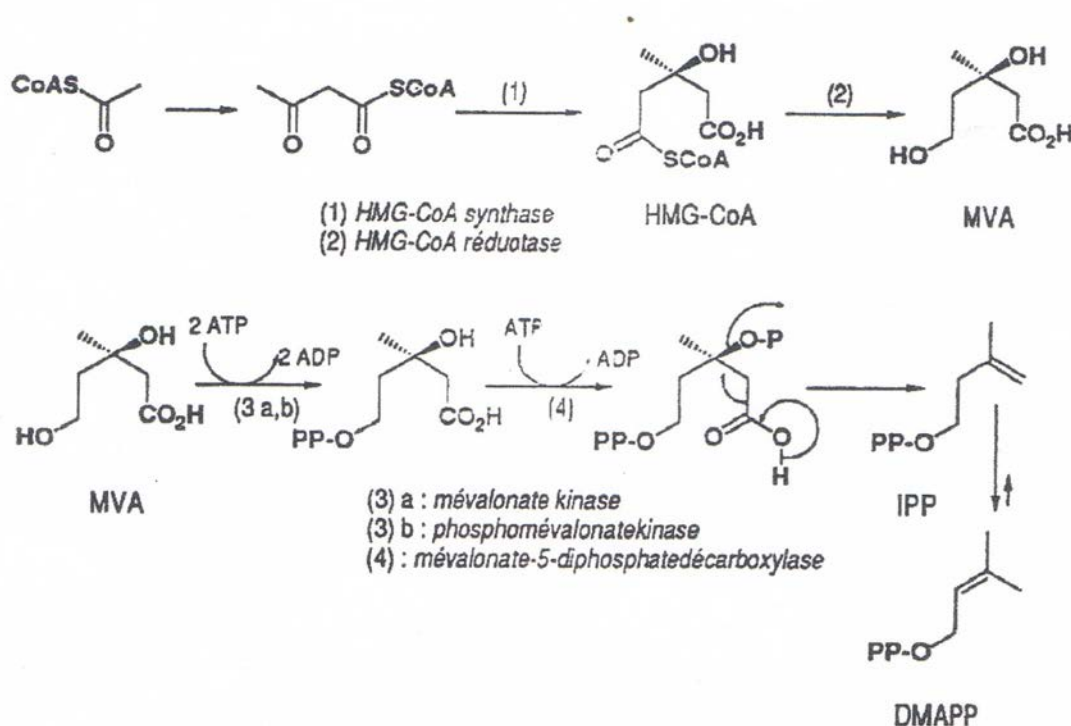


Figure 10: Biosynthèse des terpènes : origine des unités en C₅ (**Bruneton, 1999**).

Origine des unités en C₅ : Initialement le marquage isotopique permet de montrer que le squelette carboné des terpènes provenait de l'acétate. Ultérieurement, il fut démontré que l'acide mévalonique était un précurseur universel de ces composés.

L'étape initiale du processus implique la condensation des thioéthers de l'acide acétique : formation de l'acide acéto-acétique et condensation de celui-ci avec une molécule d'acétyl CoA ; la réaction est catalysée par une enzyme, l'hydroxyméthylglutaryl Coenzyme A synthétase. Une autre enzyme, l'hydroxyméthylglutaryl A réductase, réduit spécifiquement le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) formé en acide 3R-mévalonique (MVA).

La conversion de l'acide mévalonique en structures hémiterpéniques débute par une double phosphorylation. Une nouvelle phosphorylation permet d'introduire un bon groupe portant- le groupe pyrophosphate – dont l'élimination assistera à la décarboxylation : la mévalonate -5- diphosphate d'isopentenyle (IPP) qui est isomérisé par l'isopentenyle diphosphate Δ -isomérase en diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) (**Figure 4**) (**Brineton, 1993**).

VI.5.7.Chimiotaxonomie

Depuis un certain temps, la convergence de la chimie et de la botanique a donné naissance à une discipline nouvelle, la « chimiotaxonomie » dont le développement est spectaculaire (**Adzet et Passet, 1972**).

De même, **Rochleder (1993) (in Belaiche, 1972)**, estimait qu'une relation définie, existait entre la position systématique de la plante et les substances chimiques qu'elle renferme.

De ce fait, on peut définir la chimiotaxonomie comme étant un outil à la disposition du botaniste pour différencier des espèces, des sous espèces et des hybrides de même morphologie ; ce sont des chimiotypes et c'est sur l'analyse donnant les quantités des différents constituants d'une huile essentielle au cours de son cycle biologique qu'est basée la chimiotaxonomie (**belaiche, 1979**).

D'une certaine manière, l'essence représente la « personnalité » d'une plante qui, en tant qu'être vivant, est unique et ne peut être reproduit. Elle porte en elle l'empreinte du

végétal dont elle provient et, si elle est pure et extraite d'une manière correcte et respectueuse, elle est extrêmement puissante (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

On entend par chimiotype, le type chimique d'une plante classé en fonction du constituant majoritaire de ses huiles essentielles. Par ailleurs, on entend par chimiotype mixte ou intermédiaire, le type chimique d'une plante classé en fonction de deux ou plusieurs constituants majoritaires de prépondérances voisines. Selon **Wichtel et Anton (1999)**, deux chercheurs ont travaillé sur deux échantillons du calament, ils ont trouvé que l'une des deux essences est d'un chimiotype (pulégone- menton- isomenthose), par contre l'autre échantillon appartient à un chimiotype totalement différent (carvone-1.8 cinéole- limonène). Puisque chaque chimiotype possède un profil chimique qui lui est propre, les applications thérapeutiques qui en résultent sont évidemment différentes.

Des solutions aqueuses d'huiles essentielles, surtout celles de la famille des lamiacées (lavande, sauge romarin, thym), facilitent les processus de répartition des tissus et stimulent la cicatrisation des plaies et des ulcères cutanés, en préservant les surinfections bactériennes.

Les propriétés **antiparasitaires** de certaines essences (de thym, de géranium et de laurier) se manifestent en éloignant certains insectes, vers et moustiques et dans le traitement des pédiculoses et de la gale.

Certaines essences sont dotées de propriétés antitoxiques et antivenimeuses : elles contribuent à neutraliser le venin des guêpes, des abeilles et des araignées (par exemple la lavande et le géranium).

De nombreuses essences ont des propriétés **antirhumatismales** et **antinévralgiques** (par exemple le romarin ou la camomille), utiles pour le traitement d'affections douloureuses articulaires (arthrose, goutte). Elles agissent aussi lorsqu'elles sont appliquées localement par compresse ou par massage grâce à leur grande capacité de propagation, de l'épiderme aux tissus profonds.

La plupart des essences (par exemples le pin le géranium le basilic la sarriette et le romarin) sont stimulantes et tonifiantes au niveau des glandes endocriniennes, entre autres le cortex surrénal responsables de la capacité de résister au stress.

De nombreuses essences ont des propriétés stimulantes sur l'appareil génital et sur la sensualité (par exemple le jasmin, le néroli ou le patchouli).

L'action **antispasmodique** est commune à de nombreuses essences (par exemple la lavande, la marjolaine, la verveine et mélisse). Elle permet de traiter des cas de spasmes viscéraux tels que les coliques, le syndrome du côlon irritable, le hoquet ainsi que la tendance aux coliques hépatiques ou rénales.

Certaines essences (par exemple la sauge, le cyprès, la verveine ou le fenouil) ont des propriétés **hormonales**, elles exercent une action de régulation sur les glandes endocriniennes sans s'y substituer (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

La renaissance de l'aromathérapie marque une nouvelle étape dans la consécration scientifique d'une branche très importante qui est la phytothérapie (**Chiej, 1982**).

VII. La phytothérapie

C'est le traitement des maladies par les plantes, transformée depuis le XIX^{ème} siècle par l'emploi des extraits de plantes, puis par celui des substances actives isolées de celles-ci (**Domar et Bourneuf, 1990**). La phytothérapie contemporaine est devenue une véritable science.

L'exploration de la flore du globe étant loin d'être complète de nouvelles découvertes étant faites chaque jour sur les propriétés de certaines plantes, l'étude des vertus médicinales des plantes connues ou inconnues nous réserve encore, assurément beaucoup de surprises.

On peut affirmer que non seulement la médecine par les plantes est une médecine d'aujourd'hui, mais qu'elle connaît même un regain d'actualité grâce aux progrès de la science.

Médecine lente, peut-être, mais peu à peu bienfaisante et toujours inoffensive, la médecine par les simples ne devrait plus, dans notre monde actuel, être considérée comme une médecine en marge de la médecine officielle, mais devrait s'intégrer à celle-ci pour le plus grand bien du malade.

En apportant à la thérapeutique moderne sa précieuse et éternelle participation, cette médecine des premiers âges redonne au monde un peu de cette sagesse antique dont une civilisation outrancière nous a dépouillé (**Debuigue, 1984**).

VIII. Mode d'emploi des plantes médicinales

Pour assurer l'action du médicament, il est nécessaire de traiter la plante, de la transformer pour en tirer la substance ayant une action spécifique.

Etant donné la multiplicité des composants constituant les principes actifs de chaque plante et la spécificité d'action de chacun d'entre eux, il a été nécessaire d'élaborer des méthodologies diverses, qui permettent, selon le but recherché, leur extraction (**Chiej, 1982**).

Ces manipulations sont au nombre de quatre : la décoction ; la macération, l'infusion et l'extraction des sucs.

VIII. 1. La décoction

La décoction s'applique en général aux racines, écorces, bois, rameaux, fruits... (**Baba Aissa, 1999**), le processus d'extraction par décoction consiste à faire bouillir, dans de l'eau, une partie ou la totalité de la plante, pendant un temps déterminé (10 à 30mn), de la laisser ensuite macérer pendant un autre laps de temps et de procéder enfin au filtrage à l'aide d'un papier spécial ou d'une toile à trame fine (**Chiej, 1982**).

On prend, généralement, 10 g d'eau pour un gramme de produit végétal (**Volak et Stodola, 1983**).

VIII. 2. L'infusion

L'infusion est la forme de préparation la simple : 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**). L'infusion s'obtient en versant de l'eau bouillante sur une quantité déterminée de plante. Le récipient sera en terre cuite ou en verre afin d'éviter la formation de tannate de fer, qui se dépose sur les ustensiles métalliques et qui est provoqué par la présence de tanin dans les plantes. Après avoir versé l'eau bouillante, on recouvrira aussitôt le récipient de son couvercle, afin de provoquer la condensation des vapeurs riches en produits volatils et leur retombée dans le liquide d'infusion, on effectuera le filtrage indispensable avant toute utilisation (**Chiej, 1982**).

On emploie, en général, comme pour la décoction, une part de produit végétale pour dix parts d'eau.

VIII. 3. La macération

Les macérations concernent généralement les plantes dont les substances actives risquent de disparaître ou de se dégrader sous l'effet de la chaleur (par ébullition), elles peuvent être définies comme des infusions froides de longue durée (de plusieurs jours) (**Baba Aissa, 1999**).

Cette préparation s'obtient en mettant les plantes, en contact, à froid, avec un liquide quelconque. Ce liquide peut être du vin, de l'alcool, de l'eau ou de l'huile. Le temps de contact est parfois très long, en effet, les plantes aromatiques ou amères devront macérer entre deux et douze heures. Les macérations à l'eau sont plus rarement employées, car elles ont l'inconvénient de fermenter facilement, ne doivent pas, de toute manière, excéder une dizaine d'heures (**Debuigue, 1984**).

Sauf indication médicale, les macérations se préparent à raison d'une part de plante pour vingt parts de liquide (**Volak et Stodola, 1983**).

Les produits obtenus par ces trois préparations donnent lieu cependant à des critiques fondées : ainsi, les travaux de W. Hameister (**in Wichtel et Anton, 1999**) montrent que l'ébullition d'une plante conduit à une infusion bactériologiquement propre, par contre, le nombre de germes est élevé pour les extraits aqueux préparés par décoction et encore plus pour les extraits préparés à froid (macération).

VIII. 4. L'extraction des sucs

Ce procédé exige que les plantes soient absolument fraîches et riches en humidité. Les sucs contiennent les sels minéraux, les vitamines que la plante a élaborées. Ainsi que les autres substances obtenues par pression. Par cette méthode, on n'obtient pas tous les principes actifs, mais la structure des composants sensibles à la chaleur ne sera pas modifiée. Pour une utilisation domestique, on peut extraire les sucs en procédant à une ébullition rapide de la plante fraîche, suivie de pressions successives, faites à l'aide d'un appareil approprié, telle une petite presse, ou grâce-à une centrifugeuse moderne qui permet la récupération de presque tous les sucs contenus dans la plante (**Chiej, 1982**).

VIII. 5. Autres modes de préparation

En dehors des trois préparations classiques des plantes médicinales par les procédés d'infusion, de macération et de décoction, on utilise encore les plantes sous forme de poudre, de cataplasme ou de fumigation.

a. Poudre

Les plantes desséchées (entières ou feuilles, graines, racines ou écorces) sont broyées, puis incorporées aux aliments (marmelade, confiture).

b. Cataplasme

Les cataplasmes peuvent s'apprêter avec divers organes de la plante (bourgeons, feuilles, fleurs, fruits, graines, racines, écorces). Ils sont utilisés en applications externes pour traiter essentiellement les ecchymoses, les foulures, les brûlures, les ulcérations, certaines plaies, les inflammations, les douleurs nerveuses ou musculaires, certaines formes rhumatismales, etc. **(Baba Aissa, 1999)**.

Il consiste à appliquer sur la peau des préparations de consistance molle et pâteuse ou encore des préparations de plantes râpées ou écrasées, on utilise aussi des plantes amollies par infusion ou par décoction, dont on fait une espèce de coussin introduit entre deux linges et qu'on applique sur la partie malade.

Les cataplasmes peuvent être émollients, maturatifs, calmants, ou rubéfiants. **(Debuigue, 1984)**.

c. Fumigation

On fait bouillir ou brûler des plantes, de façon à bénéficier des propriétés thérapeutiques des vapeurs ou fumées produites. Ces vapeurs des plantes aromatiques ont un grand pouvoir désinfectant. Cependant, le malade, parfois, doit humer directement ces vapeurs bienfaisantes en se plaçant au-dessus du récipient retiré du feu, la tête recouverte d'une serviette : il inspire à fond et fait alors une inhalation.

Aussi, la fumée qui se dégage lorsqu'on fait brûler lentement les plantes, sur les braises du foyer, sert à purifier l'air des chambres des malades **(Debuigue, 1984)**.

CHAPITRE II

Marrubium vulgare L

I. Introduction

Le marrube blanc est une plante herbacée, vivace, du genre *Marrubium* et de la famille des Lamiaceae.

Les botanistes la nomme "*Marrubium vulgare*", nous la connaissons sous des noms communs, tels que: marrube blanc, marrube commun, herbe à la Vierge, herbe aux crocs, marrube vulgaire, marrube des champs, bonhomme, bouenriblé, mariblé,...

II. Généralité sur la famille des lamiacée

Les Labiées ou Lamiacées constituent une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones herbacées ou légèrement ligneuses et comprennent, selon les auteurs, de 233 à 263 genres et de 6900 à 7200 espèces (**Grayer et al., 2003; Heywood et al., 2007**) qui se répartissent sur tout le globe .C'est une famille très importante en Algérie, représentée par 28 genres et 146 espèces.

La plupart des plantes de cette famille sont partiellement ligneuses, formant des arbustes (très rarement des arbres). C'est la famille des aromatiques utilisées tant en cuisine qu'en parfumerie ou en pharmacie également, comme par exemple la ballote, le basilic, la bugle, l'hysope, la lavande, la marjolaine, la mélisse,...). Il s'agit d'une vaste famille, très typique du monde végétal, et qui possède une importance économique due a la production des huiles essentielles (**Guignard et al., 2001**) et de miel (les miels de lavande, et de romarin sont réputés). Cette famille est très répandue dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes) (**Guignard et al., 2001**).

III. Classification

La famille des Lamiacées possède une distribution cosmopolite et des caractères morphologiques.

En 1789 **De Jussieu** a nommé la famille Lamiacées, la classification de la majorité des sous-familles a été faite par **Bentham** en 1876 et la révision a été présentée par **Briquet** en 1895. La classification de ce dernier a longtemps été la plus utilisée pour cette famille de plantes. En 1992, 21 genres de Verbénacées ont été transférés aux Lamiacées (**Cantino, 1992**).

III .1. Ancienne Classification

Embranchement	Spermaphytes (plantes à graines)
Sous embranchement	Angiospermes (plantes à ovaire)
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales (pétales soudés)
Série	Superovariées Tétracycliques (ovairesupère, 1 seul verticale d'étamines)
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées (<i>Lamiaceae</i>)

Cependant, les rapports récents de la biologie moléculaire et le développement de la systématique moléculaire basée sur l'analyse des séquences de gènes, ont bouleversé les classifications usuelles et ont proposé en 1998 une nouvelle classification ordinaire des plantes (APG., 1998).

III .2. Classification selon l'APG (Angiosperm Phylogeny Group)

Règne	Plantae
Angiospermes ou Magnoliophyta	
Euangiospermes	
Eudicotylédones	
Eudicotylédone Supérieures gamopétales : Astéridées	
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae

La classification APG est la classification scientifique des Angiospermes la plus récente établie selon les travaux d'un groupe de chercheurs, the Angiosperm Phylogeny Group. Elle traduit les efforts faits en systématique pour que les systèmes de classification reflètent au mieux la phylogénie des familles mise en lumière par les avancées constantes de la génétique (Spichiger *et al.*, 2000).

Cette classification, révisée en 2003 (APG, 2003) et basée en grande partie sur les analyses des gènes chloroplastiques, introduit, même au niveau des familles, des changements notables avec la classification classique. Par exemple, l'ancienne famille des Liliacées est maintenant éclatée en une dizaine de famille.

IV. L'espèce étudiée

Marrubium vulgare L

En Arabe est connue par le nom Marrioua (Al kadi, 1989), au Maroc c'est Merrîwt (Novak *et al.*, 1966), un autre en Tunis Marroubia (Bellakhdar, 1997), en français : Marrube blanc et en Anglais : Harehound et en Italien : Marrubio (Quezel et Santa, 1962 ; 1963).



Figure 11: *Marrubium vulgare* L.

IV .1. Historique

Connu depuis la plus haute antiquité, les égyptiens l'utilisèrent, comme principal ingrédient, dans un antidote des poisons végétaux. Elle était déjà considérée comme le spécifique des affections de l'appareil respiratoire dans l'Egypte et la Grèce anciennes. Le Moyen Age, qui l'employait couramment dans le traitement des mêmes maux, l'a de surcroit reconnu tonique, cholagogue et diurétique. Elle est considérée par J.-E Gilibert (1798) comme « l'une des meilleures plantes d'Europe » (Schlempher *et al.*, 1996).

IV .2. Classification botanique Selon [APG III].

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

IV .3. Aspect botanique

Le marrube blanc est une plante herbacée vivace pouvant atteindre 80 cm de hauteur, à tige quadrangulaire cotonneuse (Aouadhi, 2010).

Plante à odeur de thym au froissement, couverte d'un duvet blanc, à tiges dressées, portant souvent de nombreuses pousses courtes et stériles. (Schlempher *et al.*, 1996).

Les feuilles pétiolées, ovales ou arrondies, à limbe crénelé sur les bords sont blanchâtres et duveteux sur la face inférieure. Les fleurs petites, blanches, avec un calice à dents crochues sont groupées en verticilles globuleux à l'aisselle des feuilles (Aouadhi, 2010).

Fruits : 4 petits akènes cachés à la base du calice persistant (une des particularités de la famille des Labiacée) (Schlempher *et al.*, 1996).

Toute la plante dégage une odeur forte, sa saveur est âcre (qui irrite les organes du goût et de l'odorat) et amère (Aouadhi, 2010).



Figure 12: La plante *Marrubium vulgare* L (Weel KGC *et al.*, 1999).

En Algérie, on retrouve 6 espèces différentes au sein de ce même genre : *Marrubium vulgare* L, *Marrubium supinum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssode* Pomel et *Marrubium deserti* de Noé.

IV.4. Aspect phytochimique

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Marrubium* (Ashkenazy *et al.*, 1983) au regard des données bibliographiques ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes et les tanins.

IV.5. Origine

Presque toute l'Europe en dehors de l'Extrême Nord, surtout la région méditerranéenne, Afrique de nord, Asie.

Lieux incultes, décombres, terrains vagues, prairies chaudes et sèches, garrigues. En général sur sols calcaires (Schlempher *et al.*, 1996).

IV .6. Propriétés et utilisation

Parties utilisées : Feuilles et sommités fleuris

Mode d'utilisation : Infusion, décoction, cataplasmes.

Les feuilles sont utilisées dans des toniques, liqueurs, bières, bonbons expectorants et antiseptiques contre la toux.

L'infusion digestive, laxative, relâche les muscles, contribue à l'expulsion du mucus et combat bronchite, croup et asthme.

Tonique du foie, détruit les vers intestinaux.

En usage externe et interne contre eczéma et zona.

Action sédative permettant de réguler tachycardie et arythmie cardiaque.

L'infusion chaude aide à faire tomber la fièvre, lorsque la quinine est inefficace, elle est proposée contre la malaria.

Les Navajo administraient une décoction de racine aux mères avant et après l'accouchement.

La marrubiine étant insoluble dans l'eau, on emploie de préférence la teinture (13-25 gouttes, 4 fois par jour) (Weel *et al.*, 1999).

IV .6.1. Effets nocifs de la plante

- Selon les résultats d'essais sur les lapins, le marrube aurait une action hypoglycémiant. On recommande donc la prudence dans le cas de diabétiques sous médiation (Weel *et al.*, 1999).
- On recommande généralement aux femmes enceintes d'éviter le marrube parce qu'elle stimulerait l'utérus et pourrait avoir une action abortive (Weel *et al.*, 1999).

IV.6.2. Contre-indications et effets indésirables

On recommande généralement aux femmes enceintes d'éviter le Marrube blanc parce que, selon la Commission Européenne, la plante stimulerait l'utérus et pourrait avoir une action abortive. Selon la même source (Commission Européenne) le Marrube ne possède jusqu'à présent aucun effet indésirable.

Les vertus curatives de l'espèce *Marrubium vulgare* sont sans doute liées à l'existence de certaines substances chimiques dans la totalité de la plante.

IV .7. Composition

Cette plante possède des lactones diterpéniques, tels que : la marrubiine, prémarrubiine, pérégrinol, vulgatol, marrubbéno, marrubiol,...

Le marrube blanc contient, en outre, des minéraux tels que : le potassium et surtout beaucoup de fer.

Elle présente également un certain taux de composés azotés caractéristiques de sa famille, tels que : choline, stachydrine, bétonicine,...

On retrouve également des saponosides, des flavonoides (Hétérosides flavoniques et flavonoliques du quercétol, de la lutéoline et de l'apigénine, lactoylflavones, dérivés de l'acide ursolique), des musilages, des résines, un peu d'huile essentielle (alpha-pinène, camphène, limonène, sabinène, para-cymène, para-fenchène,...) et des tannins (Schlempher *et al.*, 1996).

IV .8. Huile essentielles de *Marrubium vulgare* L

Caractéristiques organoleptiques :

Les parties utilisées pour extraire l'huile essentielles sont les sommités fleuries et les feuilles.

L'huile essentielle de *Marrubium vulgare L* est d'une odeur forte et fétide avec une saveur aromatique, amère et acre (**Schlempher et al., 1996**).

IV .9. Répartition géographique

Cette plante est commune dans toute l'Algérie et presque dans toute l'Europe en dehors de l'extrême Nord, Australie et New Zélande (**Baba aissa, 1999**).

Elle se trouve aussi au Maroc et en Tunisie, surtout en région méditerranéenne (**Bonnier, 1990**).

IV .10. Utilisation traditionnelle

Le marrube blanc est une prescrit dans le traitement des difficultés respiratoires, des bronchites, des bronchectasies, des bronchites asthmatiformes des toux sèches et de la coqueluche. Il fluidifie les mucosités. La décoction est employée comme antidiabétique (**Bellakhdar, 1997**).

Le *Marrubium vulgare* est indiqué pour les dermatoses, eczéma chronique, hystérie (**Valnet, 1983**).

IV .11. Toxicité

C'est une plante amère à caractère salin et ne peut donc pas être toléré s'il y a une gastroentérite ou des situations de nausées ou de vomissements ou encore en cas de dyspepsie (**Aouadhi, 2010**).

CHAPITRE III

Activité antibactérienne

I. Introduction

Dès la naissance l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (**Kaufmann, 1997**).

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale. Suite à cette préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre les infections bactériennes, il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques classiques.

Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, ... etc. qui possèdent des activités antimicrobiennes. De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques.

II. Généralités

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires).elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bactéries.

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1µm. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet

(bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique (**Nauciel et Vildé, 2005**).

III. Culture des bactéries

On utilise habituellement pour cultiver les bactéries des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40°C.

En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe.). L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon (**Nauciel et Vildé, 2005**).

IV. Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (**Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995**).

La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments (**Billing et Sherman, 1998**).

IV. 1. Classification des antibiotiques

Il existe plusieurs classifications des antibiotiques, elles sont basées sur le spectre d'action, la cible, ou la famille chimique. Cette dernière celle-ci est la plus fréquemment rencontrée.

Les principales familles chimiques des antibiotiques sont: Bêtalactamines: pénicilline et céphalosporines; Aminosides: streptomycine, gentamycine; Chloramphénicol et thiamphénicol; Cyclines: tétracyclines, doxycycline. Macrolides et apparentés : érythromycine, oléandomycine (Cohen et Jacquot, 2001).

V. Activités antimicrobiennes des métabolites secondaires

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement du à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Cowan, 1999). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Scalbert, 1991).

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus d'attention du à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols, à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (Daglia, 2011).

La quercétine et la naringénine sont rapportés être des inhibiteurs de *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* et *Saccharomyces cerevisiae* (Sandhar et al., 2011). En outre, la morine-3-O-lyxoside, morine-3-O-arabinoside et la quercétine-3-O-arabinoside possèdent une action bactériostatique sur les bactéries pathogènes contaminant les denrées alimentaires y compris *Bacillus stearothermophilus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteric*, *Staphylococcus aureus* et *Vibrio cholera*. Les flavonones ayant un groupement de sucre ont aussi montré une activité antimicrobienne, tandis que certaines flavonolignanes n'ont montré aucune activité inhibitrice envers les microorganismes (Sandhar et al, 2011).

VI. Description des bactéries étudiées

a. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à gram négatif (Patrick *et al.*, 1988), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm (Steven *et al.*, 2004).

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies (Patrick *et al.*, 1988).

b. *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 µm. Elles sont regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (Patrick *et al.*, 1988). *S. aureus* représente est la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée (Steven *et al.*, 2004).

c. *Staphylococcus epidermidis*

Les colonies de *S. epidermidis* sont, en général, petites, blanches ou beiges, et ont un diamètre d'environ 1-2 mm après une incubation d'une nuit. L'organisation en colonie est sensible à la des ferrioxamine, et ce test peut être employé pour le distinguer de presque tous les autres staphylocoques.

Cette espèce est positive à la catalase, négative pour la coagulase et se retrouve fréquemment sur la peau et les muqueuses des humains et des animaux. Due à sa facilité de contamination, *S. epidermidis* est probablement l'espèce la plus commune.

Bien que *S. epidermidis* soit habituellement non pathogène, c'est une cause importante d'infections chez les patients dont le système immunitaire est compromis ou des patients qui ont des cathéters, des prothèses. Ce microorganisme est responsable d'infections cutanées,

d'infections nasales comme des sinusites, d'infections urinaires chez la femme et l'homme. Ces bactéries ont la capacité de produire des biofilms qui leur permettent d'adhérer aux surfaces des prothèses médicales.

S. epidermidis est souvent résistante à une grande variété d'antibiotiques, y compris la pénicilline et la méthicilline (**Monsen T et al., 1998**).

d. *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 µm de long et 0.5 à 0.8 µm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche, ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron ».

P. aeruginosa ne forme ni spores ni sphéroplastes. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3ème rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le 1^{er} rang pour les infections pulmonaires basses et le 3ème rang pour les infections urinaires (**Richard et Kiredjian, 1995**).

e. *Micrococcus luteus*

Micrococcus est un genre de bactéries à coloration Gram positif appartenant à la famille des *Micrococcaceae*, décrit pour la première fois en 1872 par **Cohn**.

Les cellules sont des coques de 0,5 à 2 µm de diamètre, souvent groupées en tétrades ou en amas irréguliers, généralement immobiles. Ce sont des bactéries aérobies, à métabolisme oxydatif, possédant une catalase, chimio-organotrophe. La paroi cellulaire de *Micrococcus* est importante et peut faire jusqu'à 50 % de la masse cellulaire. Son génome est riche en guanine et cytosine (GC). Ces bactéries ont de nombreux habitats, notamment le sol, les eaux douces, les aliments mais leur habitat primaire est la peau des mammifères.

Micrococcus est généralement considéré comme un organisme saprophyte ou commensal. Il peut cependant être un pathogène opportuniste, notamment chez les patients immunodéprimés (comme les patients infectés par le VIH). Chez ces derniers, les microcoques peuvent être impliqués dans diverses infections, notamment des bactériémies récurrentes, des chocs septiques, de l'arthrite septique, des endocardites ou

encore des méningites. Dans de rares cas, la mort d'un patient immunodéprimé peut être due à une infection pulmonaire à *Micrococcus*.

Il peut être difficile d'identifier *Micrococcus* comme cause d'une infection, car il est normalement présent dans la microflore de la peau humaine et que le genre est rarement impliqué dans une infection (hormis dans les cas cités plus haut). La culture de cette bactérie dans un échantillon de sang est en général une contamination du prélèvement, sauf chez les personnes immunodéprimées ou chez les porteurs du virus VIH et étant atteint du SIDA (**Johnson et al., 1984**).

f. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est une bactérie pathogène en forme de bâtonnet aérobie gram positif qui envahit le cytoplasme des cellules vivantes. Il développe une structure distinctive fusée queue pour aider à pousser à travers le cytoplasme. Finalement, ces «fusées» poussent les bactéries dans les cellules voisines, la propagation de l'infection.

- *Listeria monocytogenes* se trouve dans le sol et l'eau.
- Les légumes peuvent être contaminés par le sol ou du fumier utilisé comme engrais.
- Les animaux peuvent transporter la bactérie sans paraître malade et peuvent contaminer les aliments d'origine animale tels que les viandes et les produits laitiers.
- La bactérie a été trouvée dans les viandes crues et les légumes, les fromages à pâte molle, froid coupes de charcuterie, et le lait ou les aliments non pasteurisés.
- Si acquise à la naissance, la période d'incubation est de 7 à 28 jours.
- La période d'incubation moyenne est de 31 jours; avec une gamme de 11 à 47 jours. (**Émilie Retureau et al., 2010**).

g. *Enterococcus durans*

Enterococcus durans est une espèce d'*Enterococcus* à Gram positif, catalase et oxydase négative. Avant 1984, il était connu comme *Streptococcus durans*.

Entérocoques font partie de la flore intestinale normale des humains et des animaux. Ils ont été longtemps reconnus comme des agents pathogènes humains importants et sont de plus en plus. Le genre *Enterococcus* comprend plus de 17 espèces, bien que quelques-uns seulement causer des infections cliniques chez l'homme. Depuis le début de l'ère des antibiotiques, ils ont posé des défis majeurs thérapeutiques, y compris la nécessité d'une

combinaison synergique d'antibiotiques pour traiter avec succès entérocoques endocardite infectieuse (IE) (**Collins *et al.*, 1986**).

CHAPITRE IV

Matériels et méthodes

I. Matériel utilisé

I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude expérimentale est une espèce végétale appartenant à la famille des Lamiacées *Marrubium vulgare* L (**Figure 13**), sa taxonomie et toutes les données la concernant ont été détaillées précédemment.

L'organe végétal choisi pour la réalisation des expérimentations de cette étude est la feuille puisque c'est à son niveau que se trouve la majorité des principales substances actives, en d'autre terme, c'est le lieu de synthèse et de la mise en réserve temporaire des principaux composés du métabolisme primaire et secondaire.



Figure 13 : Vue générale de la plante de *Marrubium vulgare* L prise à partir du site d'étude. (Original, 2016).

I.1.1. Site de prélèvement

Les échantillons de la plante ont été prélevés à partir d'un site de la wilaya de Tlemcen situé à 34° 53' 24" Nord et 1° 19' 12" Ouest.

Elle est située au nord-ouest de l'Algérie, à 520 km à l'ouest d'Alger, à 140 km au sud-ouest d'Oran et, proche de la frontière du Maroc, à 76 km à l'est de la ville marocaine d'Oujda. La ville est érigée dans l'arrière-pays, est distante de 40 km de la mer Méditerranée.

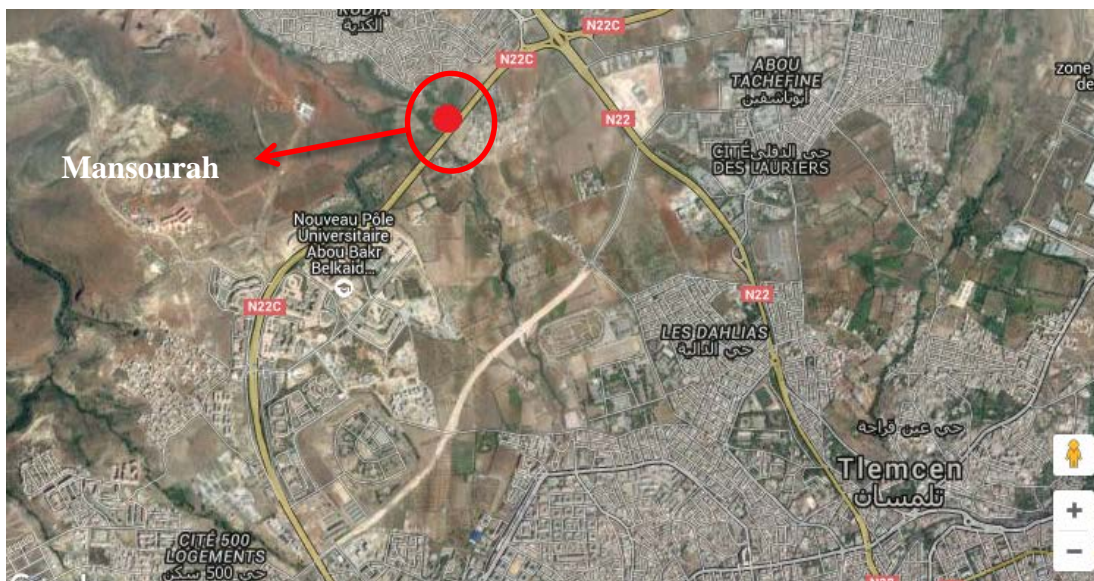


Figure 14: Localisation géographique de la zone d'étude wilaya de Tlemcen.

I.1.2. Séchage

Les plantes prélevées sont placées dans des sacs en tissus puis transportées au laboratoire en vue du séchage et des analyses.

Les feuilles sont soumises à un rinçage à l'eau de robinet pour éliminer les impuretés puis étendues en couches minces, à bonne aération pendant une semaine.

Une fois séchées, les feuilles sont soumises à un broyage manuel afin d'obtenir une poudre prête à l'emploi. La drogue obtenue est conservée dans des flacons en verre ambré en vue des expérimentations.

II. Méthode suivies

II.1. Tests biochimiques préliminaires

Un screening chimique ayant pour but la mise en évidence des différents métabolites secondaires : saponines, tanins, anthocyanes, leuco-anthocyanes, flavonoïdes, alcaloïdes, terpènes et stérols et les cardinolides a été réalisé selon des méthodes standardisées de **Solfo (1973)** et **Bouquet (1972)**.

a. Recherche des Saponosides

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Deux grammes de matériel végétal sec et broyé sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau. On porte à ébullition pendant 30 mn. Après refroidissement et

filtration, on réajuste le volume à 100 ml. Dans une série de 10 tubes à essai, répartir 1 ml de l'extrait dans le tube n° 1, 2 ml dans le tube n° 2, ..., 10 ml dans le tube n° 10. Le volume final dans chaque tube étant de nouveau réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Les tubes sont agités fortement en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 minutes en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de 1 cm dans le X^e tube, alors l'indice de mousse est calculé selon la formule suivante :

$$I = \frac{\text{Hauteur de mousse (en cm) dans le } x^{\text{e}} \text{ tube} \times 5}{0.0x}$$

I : Indice de mousse

La présence des saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (**Dahou et al., 2003**).

b. Recherche des anthocyanes

La recherche des anthocyanes repose sur le changement de la couleur de l'infusé à 10 % avec le changement de pH :

On ajoute quelques gouttes d'HCl, puis quelques gouttes d'Ammoniac (NH₄OH). Le changement de la couleur indique la présence des anthocyanes.

c. Recherche des leuco anthocyanes

Un volume de 5 ml de l'infusé est mélangé à 4 ml d'alcool chlorhydrique (Ethanol/ HCl pur 3/1 v/v). Après chauffage au bain marie à 50°C pendant quelques minutes, l'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des leuco anthocyanes (**Solfo, 1973**).

d. Recherche des flavonoïdes

Une macération de 10g de drogue pulvérisée dans 150 ml d'acide chlorhydrique (HCl 1 %) pendant 24h. Après filtration, on récupère 10 ml du filtrat auquel on ajoute une solution basique de (NH₄OH), après 3h apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube, ceci indique la présence de flavonoïdes.

e. Recherche des alcaloïdes

Après macération de 5g de feuilles séchées et broyées dans 50 ml d'HCl à 1 %, on filtre la solution obtenue et on lui ajoute quelques gouttes de réactif de Mayer qui provoque un précipité blanc indiquant la présence des alcaloïdes (**Bouquet, 1972**).

f. Recherche des Terpènes et des Stéroïdes

5 g de la poudre sont macérés dans 20 ml d'éther de pétrole, Après filtration, la phase organique est évaporée dans un évaporateur rotatif à 40°C. Le résidu est dissout dans 0.5 ml d'acide acétique (CH₃COOH) en ajoutant 1 ml d'Acide Sulfurique (H₂SO₄) concentré, dans la zone de contact entre les deux liquides apparitions d'un cercle violé ou marron devenant gris par la suite, ceci indique la présence des terpènes et stéroïdes.

g. Recherche des Cardinolides

Macération de 1g de drogue pulvérisée dans de l'eau distillée (20 ml), pendant 3h, après filtration on prélève 10 ml du macérât, auxquels on ajoute 10 ml du mélange de la solution (Chloroforme (CHCl₃), Ethanol (C₂H₅OH)). L'évaporation de la phase organique dans un évaporateur rotatif. Le précipité est ensuite dissout dans 3 ml de l'acide acétique glacial (CH₃COOH), enfin, on ajoute quelques gouttes de Chlorure de Fer (FeCl₃) puis 1 ml d'H₂SO₄ concentré. L'apparition d'une couleur verte bleue dans la phase acide indique la présence des Cardinolides.

h. Recherche des tanins

On prend 5 ml de l'infusé, aux quelle on ajoute goutte à goutte 1 ml d'une solution de Chlorure ferrique (FeCl₃) à 1%. L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des tanins catéchiques,

L'apparition d'une coloration bleu noirâtre indique la présence des tanins galliques.

II.1.1. Préparation de l'extrait brut méthanolique

Macération de 50g de drogue dans 1000 ml de mélange méthanol/eau (7:3 V/V) sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est récupéré après filtration du mélange à l'aide de papier filtre. Le mélange méthanol/eau est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un évaporateur rotatif permettant ainsi d'obtenir un résidu de couleur brune foncée qui est ensuite repris par 5 ml de méthanol. Le résidu obtenu est conservé par congélation.

II.1.2. Dosage des composés phénoliques totaux

Les composés phénoliques totaux ont été estimés selon la méthode colorimétrique basée sur le réactif de Folin Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Le réactif est formé d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄) qui sont réduits lors de l'oxydation des composés phénoliques en oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de

molybdène (Mo_8O_3). Pour cela 100 μl de l'extrait brut méthanolique sont mélangés à 200 μl du réactif de Folin et 3,16 ml de H_2O . Le mélange est incubé à température ambiante pendant 3 minutes. Ensuite 600 μl de la solution carbonate de sodium (Na_2CO_3) anhydre 20 % sont ajoutés au mélange.

Les composés phénoliques totaux sont déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre à UV (Ultra-Violets) visible après 2 heures d'incubation à température ambiante par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 765 nm. On prépare dans les mêmes conditions un témoin avec de l'eau distillée à la place de la solution de l'extrait brut. La quantification est faite selon une gamme-étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique (0 à 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide gallique par ml d'extrait (**Figure 15**).



Figure 15: préparation de la gamme d'étalonnage avec de l'acide gallique.(**Original, 2016**)

II.2. Extraction des flavonoïdes

a. Macération

A 10 g de feuilles broyées, on ajoute un volume du mélange du mélange Ethanol / Eau (80:20) puis on laisse macérer pendant trois jours avec renouvellement du solvant chaque 24 heures (350 ml x 3). Les solutions hydro-ethanoliques obtenues sont réunies dans un même récipient pour subir une filtration afin d'obtenir une solution limpide.

b. Evaporation

Elle est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor) R120 à une température comprise entre 35 à 45°C. L'extrait sec est repris par 200ml d'eau distillée bouillante, il est ensuite laissé pendant 24 heures afin de subir une décantation, puis il est filtré sur papier filtre Whatman n°1 (**Figure16**).



Figure 16: Evaporation de l'extrait par un évaporateur rotatif. (**Original, 2016**)

c. Extraction par les solvants

La phase aqueuse limpide issue des extractions successives est placée dans une ampoule à décanter de 1 l afin de subir des affrontements successifs par différents solvants.

Pour cela, nous avons utilisé l'éther de pétrole, le trichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

d. Affrontement à l'éther de pétrole

100 ml de phase aqueuse sont déversés dans une ampoule à décanter à laquelle on rajoute 100 ml d'éther de pétrole. Après une agitation énergique et un repos de quelques minutes on observe deux phases :

- La phase éther de pétrole supérieure contenant les boues,
- La phase aqueuse inférieure contenant des flavonoïdes.
- La phase éther de pétrole est récupérée dans un bécher, alors que la phase aqueuse est remise dans l'ampoule à décanter afin de subir l'affrontement au chloroforme.

e. Affrontement au chloroforme

La phase aqueuse obtenue après affrontement à l'éther est remise dans l'ampoule à décanter pour subir les mêmes opérations que précédemment. La phase aqueuse se retrouve en haut de l'ampoule et la phase chloroforme en bas; celle-ci est récupérée dans un bécher, alors que la phase aqueuse est remise dans l'ampoule à décanter pour être affrontée au solvant suivant. Le même protocole est répété pour les deux autres solvants; l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

Les différentes phases (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, butanol, et eau) sont évaporées à sec; chaque extrait est repris par un minimum de méthanol (5ml) pour être utilisé dans les tests phytochimiques et antimicrobiens.

Les différentes étapes de l'extraction des flavonoïdes sont représentées dans la figure suivante (**Figure 17**).

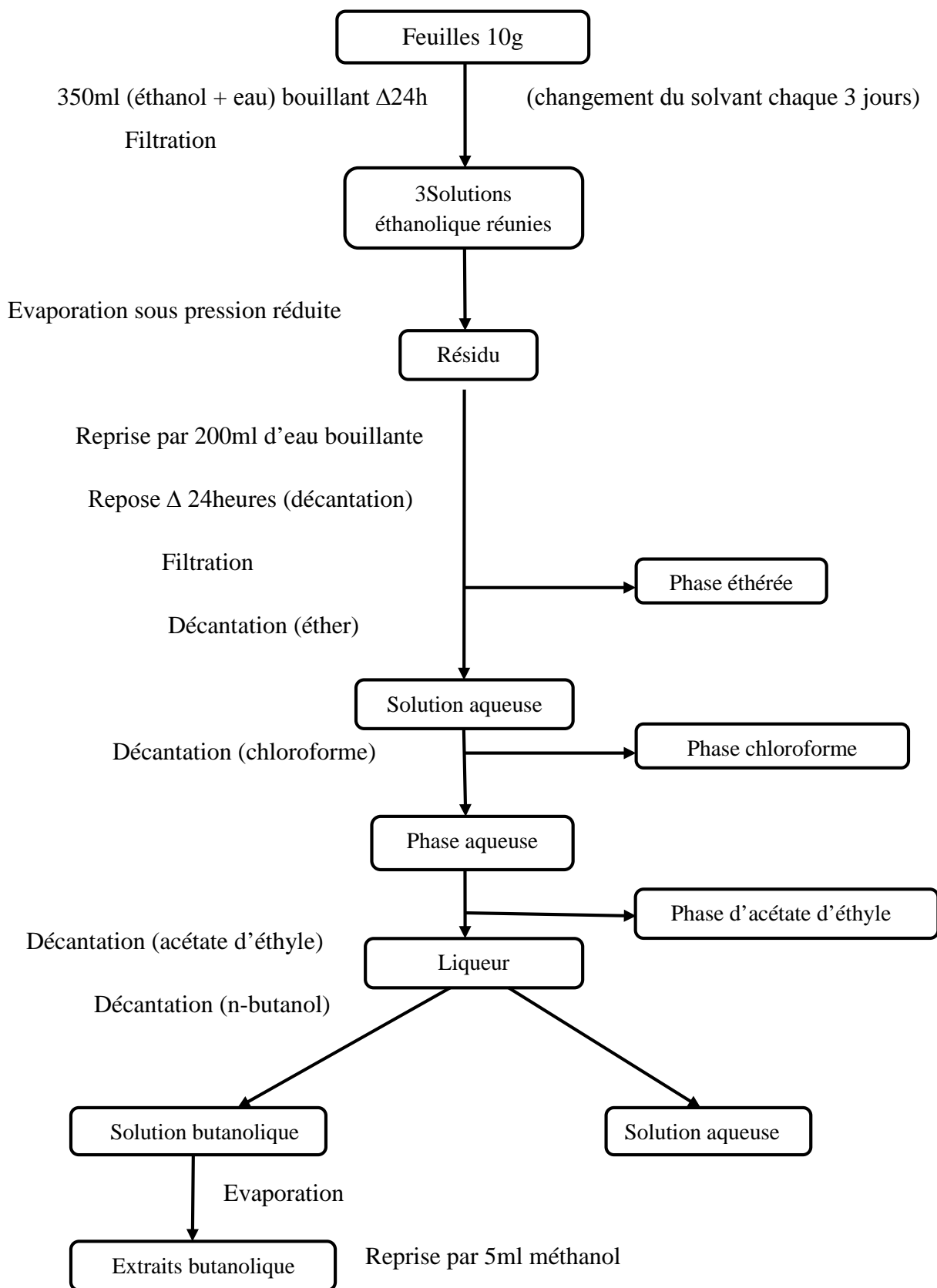


Figure 17: Schéma des différentes étapes suivies lors de l'extraction des flavonoïdes.

(Original, 2016)

II.4. La chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie de manière générale est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile (**Audigié, 1995; Edith et al., 1998**). Selon la technique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différentes dans chaque phase (**Edith et al., 1998**).

La C.C.M. est une chromatographie de partage ; elle est basée sur la différence de solubilité des substances à séparer dans deux fluides parfaitement miscibles (**René, 2002**). Le facteur principal qui intervient est le coefficient de partage entre chaque phase. Les substances les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement que celles qui le sont moins (**Audigié, 1995**).

La C.C.M. est une technique d'analyse très utile et simple à mettre en œuvre, on l'utilise en général pour suivre l'avancement d'une réaction, pour connaître la composition d'une fraction séparée sur colonne ou pour visualiser la pureté d'un produit (**Edith et al., 1998**). Les adsorbants les plus employés sont par ordre d'importance décroissante: le gel de silice, le kieselguhr et la cellulose.

L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants. Un éluant qui entraîne tous les composants de l'échantillon est trop polaire, celui qui empêche leur migration ne l'est pas suffisamment.

Le choix de l'éluant dépend des composés à séparer :

- Pour les hydrocarbures : hexanes, éther de pétrole ou benzène.
- Pour les groupements fonctionnels courants : hexane ou éther de pétrole mélangé en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique forment un éluant de polarité moyenne.
- Pour les composés polaires : éthanoate de l'éthyle, propanone ou méthanol.

a. Séparation des flavonoïdes par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les flavonoïdes extraits ont été séparés par Chromatographie sur Couche Mince dont la phase mobile choisie est un mélange De chloroforme, acétone et d'acide formique (75/16,5/8,5) (figure 18)



Figure 18 : Séparation des flavonoïdes sur CCM. (Original, 2016).

La révélation est faite sous une lampe à UV (Ultra-Violets) qui met en évidence la présence des flavonoïdes. La confirmation de la présence des flavonoïdes a été réalisée par l'ajout de Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 2 % préparé dans le méthanol. Le chlorure d'aluminium provoque le changement de la couleur des taches obtenues.

III. Activité antibactérienne

III.1. Matériels et méthodes

III.1.1. Matériel Utilisé

a. Extraits de *Marrubium vulgare*

L'extrait flavonoidique a été testé sur quelques pathogènes responsables d'infections graves chez l'homme. Des dilutions sont préparées de façon à obtenir des concentrations au $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ et $\frac{1}{6}$ à partir de la solution mère.

b. Souches bactériennes

7 souches bactériennes (Tableau 3) ont été choisies pour leur haute pathogénicité et leur résistance aux antibiotiques. Elles sont réactivées à 37 °C par repiquage sur milieu liquide Muller-Hinton (MH).

Tableau 3: Liste des souches bactériennes étudiées. (Laboratoire –LMBAFS–)

Famille	Genre et espèce	Référence	Gram
Enterobacteriacées	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	négatif
Enterococcaceae	<i>Enterococcus durans</i>	ATCC 6056	positif
Staphylococcacées	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Positif
	<i>Staphylococcus épidermidis</i>	ATCC 49139	Positif
Listeriaceae	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 13932	positif
Pseudomonadacées	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	négatif
Micrococcaceae	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10420	positif

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées dans des tubes de milieu Muller Hinton puis incubées à 37 °C pendant 16h pour avoir des cellules bactériennes à leur phase exponentielle de croissance.

III.1.2. Méthodes suivies

a. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des puits

La méthode utilisée est celle de (Collin *et al.*, 1970). Une double série de dilutions est préparée à partir de 200 µl de chaque extrait dans des tubes contenant 100 µl d'eau distillée. 100 µl de chaque tube sont alors prélevés puis transférés dans le tube suivant pour obtenir des concentrations réduites de moitié ($C^{1/2}$, $C^{1/4}$, $C^{1/6}$, etc.).

L'activité antibactérienne des flavonoïdes a été étudiée pour chaque souche bactérienne. À partir d'une culture de 16h. L'ensemencement de l'inoculum de 1 ml est réalisé dans le milieu Mueller Hinton préparé dans des tubes à essai environ 15 ml pour chaque tube puis coulé dans des boîtes de Pétri., 5 puits ont été découpés à l'aide de pipettes Pasteur pour chaque boîte pétri. Ensuite, 50 µl de l'extrait de flavonoïde et des dilutions préparés sont distribués dans chaque puits. Après diffusion de 2h dans le réfrigérateur, les cultures sont incubées dans l'étuve à une température de 37 °C pendant 24 h, et les auréoles d'inhibition sont mesurées par un pied à coulisse. Le diamètre du puits est inclus dans les tableaux des résultats (**Figure 19**).

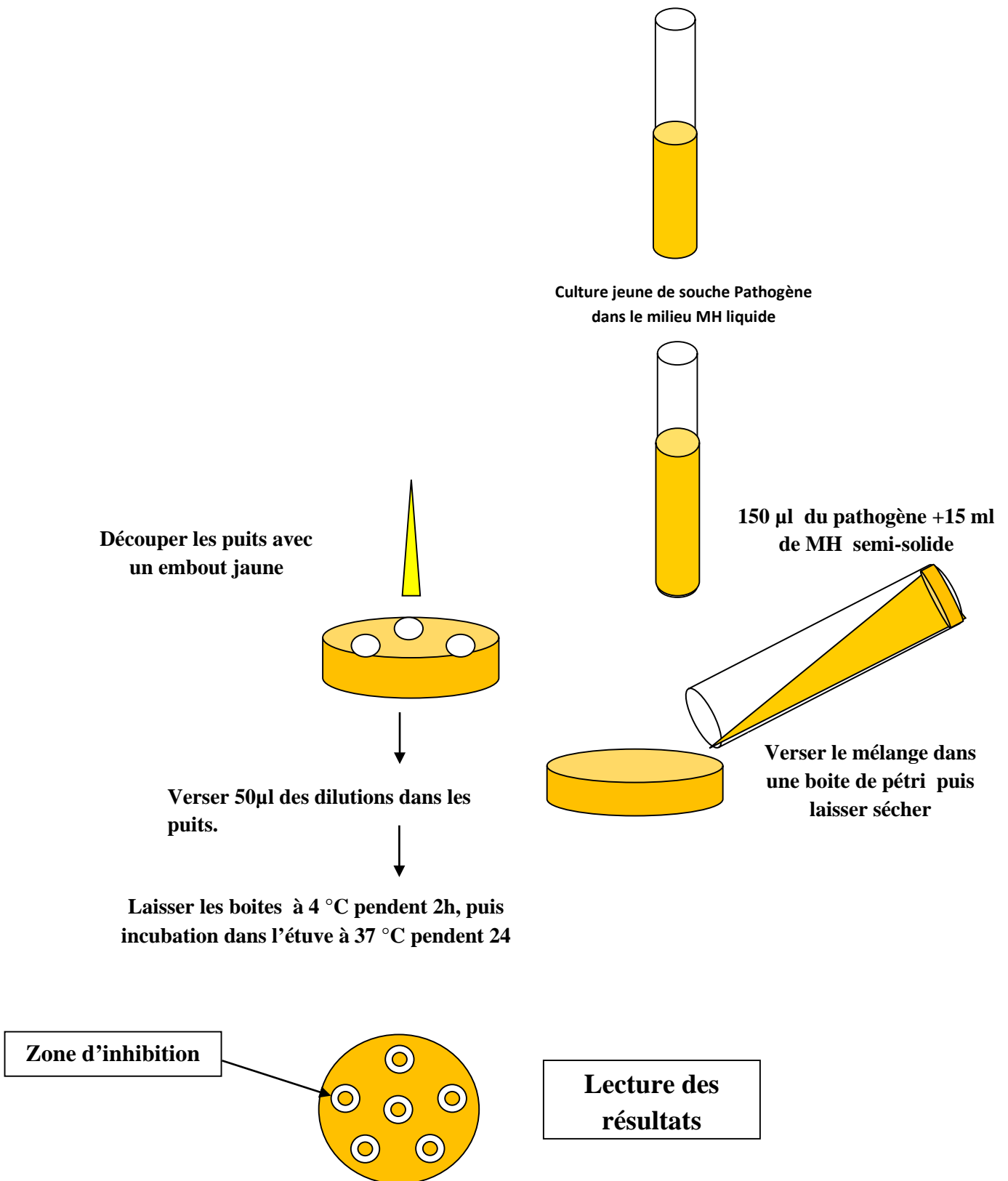


Figure 19 : Etude de l'antagonisme par la méthode de diffusion en puits ADT. (Original, 2016)

b. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur un milieu solide

Dans les mêmes boîtes pétri utilisé en activité antibactérienne ; on a pris 3 dilutions de l'extrait flavonoïdique, on mesure le diamètre d'inhibition des 3 dilutions ($C^{1/2}$, $C^{1/4}$, $C^{1/6}$).

La CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h. Sa détermination a été faite par observation des zones d'inhibition des germes étudiés dans chaque boîte. La CMI a été la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas eu de zone d'inhibition observé à l'œil nu.

CHAPITRE V

Résultats et discussion

I. Résultats de l'étude phyto-chimique

1. Tests biochimiques préliminaires

Les résultats de la mise en évidence des métabolites secondaires sont mentionnés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : La mise en évidence des métabolites secondaire au niveau des feuilles du *Marrubium vulgare L.*

Principes actifs	Présence
Saponines	(+)
Tanins catéchiques	(+)
Tanins galliques	(-)
Anthocyanes	(+)
Leuco-anthocyanes	(-)
Flavonoïdes	(+)
Alcaloïdes	(-)
Terpènes et stérols	(+)
cardinolides	(-)

(+) Présence

(-) Absence

Le tableau montre la composition de Marrube blanc ou *Marrubium vulgare L* en métabolites secondaires, d'après les résultats obtenues des tests biochimiques réalisés le marrube blanc renferme cinq principes actifs : les saponines, les tanins cathéchiques, les anthocyanes, les flavonoïdes, les terpènes et stérols (**Figure 20**), et révèlent également l'absence de quatre métabolites secondaires importantes tels que, les tanins galliques, les leuco-anthocyanes, les alcaloïdes et les cardinolides.



Figure20 : Exemple de deux tests réalisés sur la mise en évidence des terpènes et stérols et des tanins catéchiques.

2. Rendement de l'extrait brut méthanolique

Le rendement de l'extrait brut méthanolique a été quantifié selon la formule :

$$R\% = \text{PEB}/\text{PMV} \times 100$$

R : rendement

PEB : poids de l'extrait brut méthanolique (g).

PMV : poids de matière végétale (g)

Le rendement de l'extrait brut méthanolique est représenté dans le tableau suivant (**Tableau 5**)

Tableau 5 : Pourcentage de l'extrait brut méthanolique.

Poids de l'extrait (g)	Pourcentage de l'extrait (%)
13,4g	26,8%

Le rendement de l'extrait brut méthanolique de *Marrubium vulgare* L est de l'ordre de 13,4g avec un pourcentage de 26,8%.

Les teneurs en extraits secs varient d’une plante a une autre de la même famille en fonction de plusieurs paramètres de l’extraction solide-liquide des polyphénols ; le solvant d’extraction ; la taille des particules et le coefficient de la diffusion de solvant.

La méthode de macération utilisée sous agitation permet d’accélérer le processus d’extraction et le déroulement de cette extraction a une température ambiante et l’épuisement du solvant permet d’obtenir le maximum des composés.

3. Teneur des composés phénoliques totaux dans l’extrait brut méthanolique

Une courbe d’étalonnage a été réalisé avec un extrait de référence, l’acide gallique a différentes concentrations pour évaluer la teneur en composés phénolique dans l’extrait brut méthanolique.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent en acide gallique par ml d’extrait (mg EAG/ml d’extrait). La courbe d’étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation $R = 0,9956$ (Figure 21).

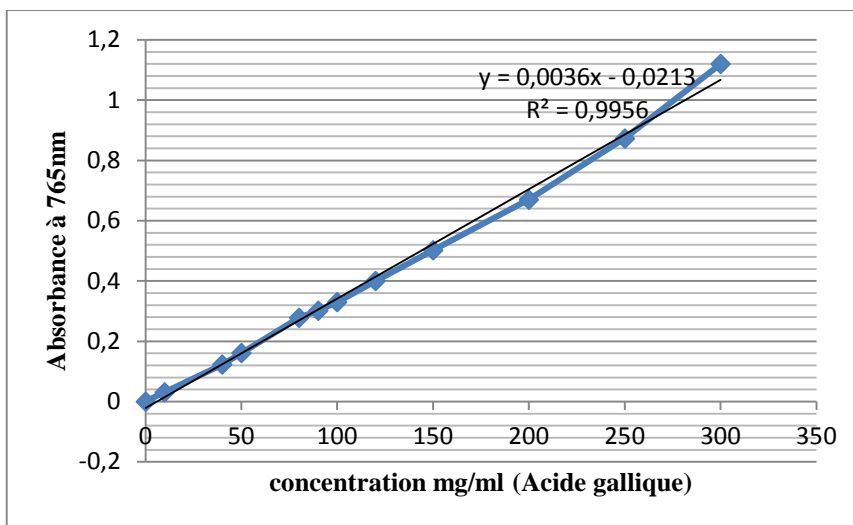


Figure 21: Courbe d’étalonnage de l’acide gallique.

Tableau 6 : Résultats de la teneur en composés phénoliques totaux de l’extrait brut méthanolique de *Marrubium vulgare L.*

	Teneur en composés phénolique en (mg EAG/ml d’extrait)
Extrait brut	839,25

Les résultats de dosage de phénols totaux révèlent que l'extrait brut méthanoïque de l'espèce *Marrubium vulgare L* contient une teneur de l'ordre de 839,25 mg équivalent acide gallique par ml d'extrait (mg EAG/ml d'extrait).

4. Teneur en flavonoïdes

Le rendement des flavonoïdes au niveau des feuilles de Marrube blanc est de 0,86g, ce qui correspond à un pourcentage de 8,6% (**Figure 22**).

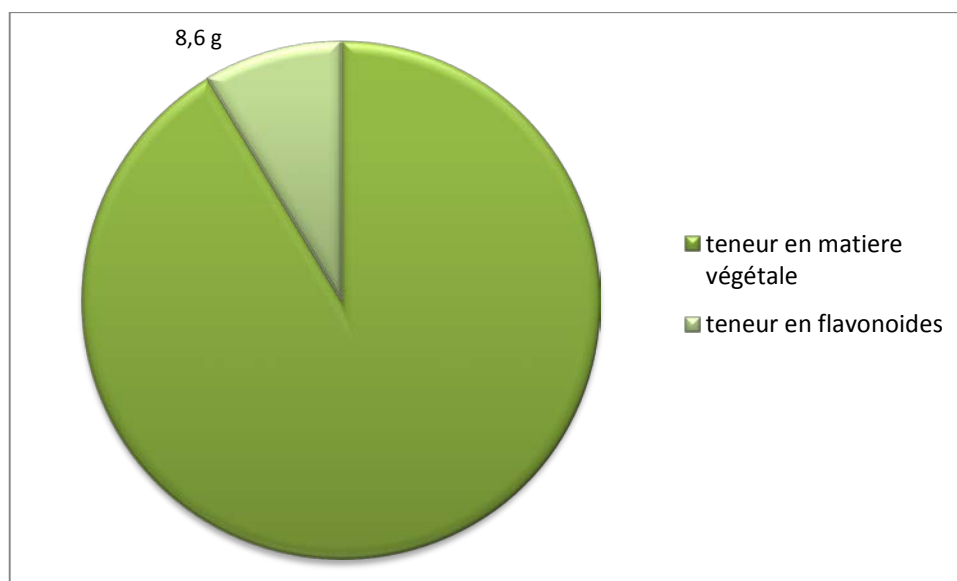


Figure 22 : Rendement des flavonoïdes des feuilles de *Marrubium vulgare L.*

La séparation des composés contenus dans les feuilles de *Marrubium vulgare L* est effectuée par l'utilisation de solvant à polarités différentes, cette méthode permet de séparer ses flavonoïdes selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et triglycosylés).

L'extraction à température ambiante permet d'obtenir le maximum de composés.

5. Chromatographie sur couche mince des flavonoïdes

La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque CCM, est effectuée en vue d'une analyse d'un extrait flavonoïdique, l'observation des chromatogrammes est effectuée sur une lampe à UV à 765nm (**Figure 23**).

L'éluant utilisée pour la migration est constitué de chloroforme, acétone et d'acide formique (75/16,5/8,5), a permis d'avoir une bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des taches, après la révélation des chromatogrammes avec $AlCl_3$, les fluorescences observées nous informent sur la présence des flavonoïdes. Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Rapports frontaux et couleurs des taches.

Taches	Rapports frontaux	couleur
Tache 1	0,59	Jaune
Tache2	0,78	Ocre

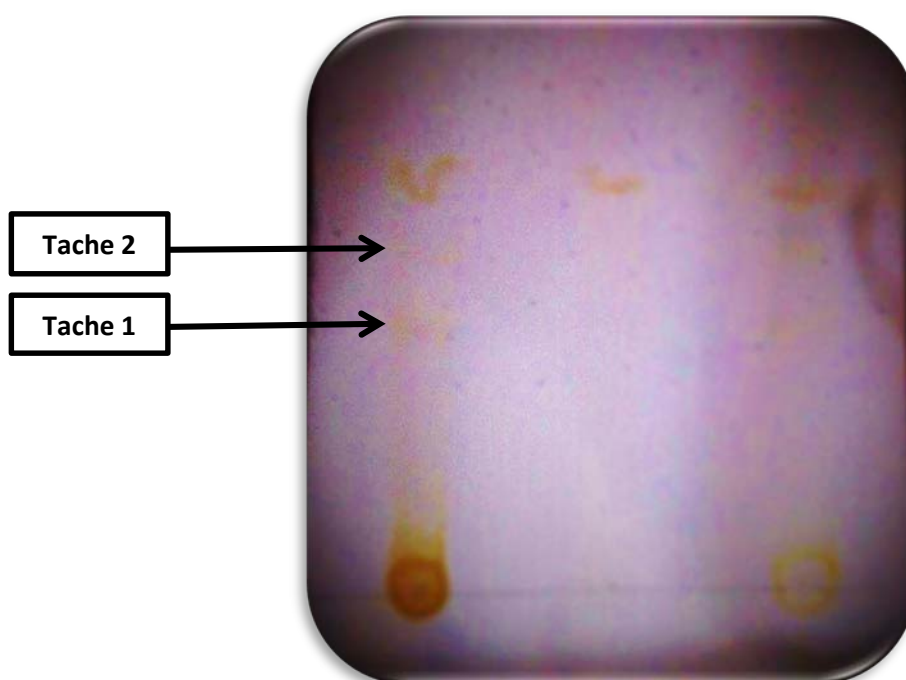


Figure 23 : Résultat de la séparation des flavonoïdes sur CCM.

L'analyse par chromatographie sur couche mince ou CCM a montré deux taches de couleur jaune et ocre après l'ajout du chlorure d'aluminium (AlCl_3) ayant pour rapports frontaux 0,59 et 0,78. Ces couleurs indiquent la présence de composés flavonoïdiques.

Discussion

Les tests biochimiques réalisés dans notre étude sur des feuilles de Marrube blanc ont mis en évidence la présence des principes actifs du métabolisme secondaire tels que : les Flavonoïdes, Saponosides, Tanins, Anthocyanes, Terpènes et Stéroïdes et l'absence des Alcaloïdes, Cardinolides et des Leucoanthocyanes.

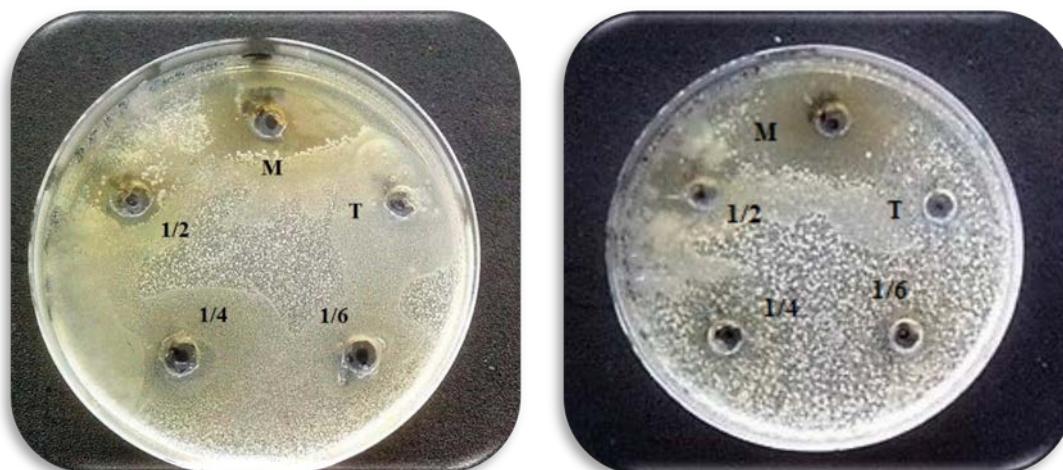
Un rendement de 39,2% de l'extrait brut a été obtenu à partir de la partie aérienne de la même espèce lors d'une étude entreprise par **Kanyonga et al. (2011)**. C'est un pourcentage supérieur à celui obtenu dans notre cas et qui est de l'ordre de 26,8%.

Le rendement de polyphénols totaux des feuilles de la plante *Marrubium vulgare L.* est de l'ordre de 839,25 (mg EAG/ml d'extrait), renfermant un taux de 8,6% de flavonoïdes. La séparation par chromatographie sur couche mince nous a permis de détecter deux familles de composés flavonoïdiques. Ces différents composés du métabolisme secondaire sont probablement responsables des différentes activités biologiques de la plante.

II. Résultats de l'activité antibactérienne

1. Activité antibactérienne de l'extrait flavonoïdique

Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne des Flavonoïdes (Flv) de *Marrubium vulgare L* sont présentés comme suit (Tableau 8, Figure 24 et 25).



S. aureus

Listeria monocytogenes

Figure 24 : Exemples de l'activité antibactérienne de l'extrait flavonoïdiques.

Le **Tableau 8** et la **Figure 25** montrent un pouvoir antibactérien important selon la souche utilisé. Les souches *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *M. luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* semblent sensibles à l'extrait flavonoïdique (M) et à la concentration $1/2$, quant aux souches *E. durans* et *S. aureus*, elles sont sensibles à l'extrait flavonoïdique (M) aux deux concentrations $1/2$ et $1/4$.

Tableau 8 : Activité antibactérienne de l'extrait flavonoïdique sur milieu Mueller-Hinton (zone d'inhibition en mm).

solutions souches	Flv (M)	Flv $1/2$	Flv $1/4$	Flv $1/6$	Eau
<i>Listeria</i>	30	17	00	00	00
<i>E. coli</i>	20	18	00	00	00
<i>E. durans</i>	20	13	11	00	00
<i>S. aureus</i>	30	14	10	00	00
<i>S. epidermidis</i>	28	00	00	00	00
<i>P. aeruginosa</i>	35	25	00	00	00
<i>M. luteus</i>	30	17	00	00	00

Les valeurs représentent les diamètres des zones d'inhibition en (mm).

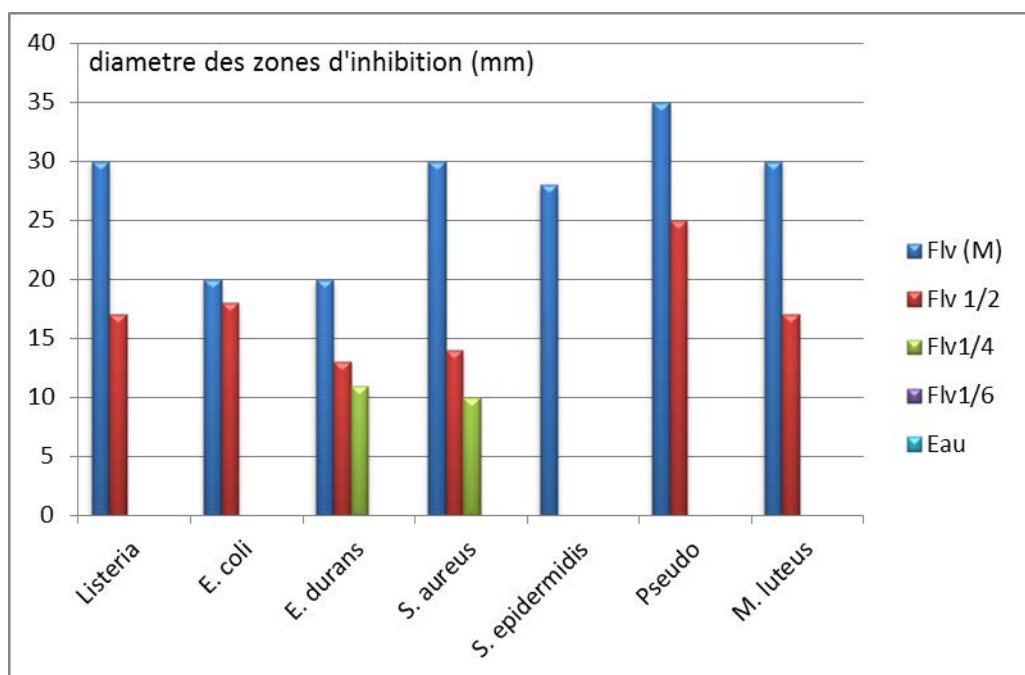


Figure 25 : Pouvoir antibactérien de l'extrait flavonoïdique.

2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI a été déterminée pour l'extrait flavonoïdique qui possède une forte activité antibactérienne.

D'après Le **Tableau 8**, la plus faible concentration ayant un effet inhibiteur sur les deux souches bactérienne *E. durans* et *S. aureus* est la concentration $1/4$ avec des zones d'inhibition et 11 et 10 mm, quant aux 4 souches *Listeria*, *E. coli*, *M. luteus* et *P. aeruginosa* la plus faible concentration qui a donné une zone d'inhibition est la concentration $1/2$ avec des diamètres de 17, 18, 25 et 17mm respectivement, concernant la souche *S. epidermidis*, elle est sensible sauf à l'extrait flavonoïdique pure.

Discussion

Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité des extraits des plantes médicinales et leur pouvoir antiseptique.

Les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 10 et 20 mm pour *Escherichia coli*, 17 et 30 mm pour *Listeria monocytogenes*, 11 et 20 mm *E. durans*, 14 et 30mm pour *Staphylococcus aureus*, 25 et 35 pour *Pseudomonas aeruginosa*, 17 et 30 mm pour *M. luteus*, par contre la souche *S. epidermidis*, elle est sensible sauf à l'extrait flavonoïdique (M). Des résultats similaires ont été obtenus par (Ulukanli et Akkaya, 2011). En ce qui concerne le

Staphylococcus aureus à partir de l'extrait de la partie aérienne d'une autre espèce de *Marrubium* : *Marrubium catariifolium*.

Cette variabilité des résultats de l'activité biologique des extraits végétaux peut dépendre du contenu en composés polyphénoliques. Les mécanismes d'action des composés naturels sont expliqués de différente manière selon les auteurs. Selon **Chabot et al. (1992)**, l'activité antimicrobienne est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés les moins polaires comme les flavonoïdes n'ayant pas de groupement hydroxyle OH sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des agents microbiens que ceux portant le groupement hydroxyle. D'autre part, **Mori et al. (1987)** ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne. Les travaux antérieurs de **Sarker et al. (2005)**, montrent également que l'effet d'un extrait est probablement due à la synergie entre le nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement. Ceci est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols (**Seidel, 2005**). Cependant, la plupart de ces petites molécules ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par les bactéries et les champignons. Si l'on se réfère aux études de **Moussaid et al. (2012)**, l'activité des principes actifs serait liée aux conditions de séchage et de broyage de la plante. D'autre part, Il semble également que le broyage avec nitrogène liquide soit recommandé, car le broyage est aussi à l'origine de la génération de la chaleur responsable de la perte des molécules volatiles ainsi que la décomposition et l'oxydation des molécules thermolabiles (**Jones et Kinghorn, 2005**).

La principale cible des composés naturels des plantes médicinales est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. Les huiles essentielles, flavonoïdes, alcaloïdes voire même les tanins pourraient induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquences des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort (**Rhayour, 2002**).

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE

L'étude phyto-chimique des feuilles de la plante *Marrubium vulgare* a permis d'obtenir un extrait brut sec 26.8%, qui renferment une teneur importante en phénols.

La plante *Marrubium vulgare* est d'une importance en thérapie, est utilisée en médecine traditionnelle, vue les composés actifs contenus dans l'extrait brut, telle que les flavonoïdes qui a un rendement de 8.6% au niveau des feuilles de la plante.

Les flavonoïdes possèdent une activité antibactérienne qui est évaluée par des tests *in vitro* contre des germes multi-résistants responsables des maladies infectieuses.

L'inhibition de la croissance bactérienne varie selon l'espèce bactérienne, et de la concentration du produit testé. Toutes les souches bactériennes testées se sont montrés sensibles, les zones d'inhibition les plus importantes sont obtenus avec *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* avec un diamètre de plus de 30mm pour l'extrait pure (M) et plus de 14mm pour la concentration $1/2$.

Pour élargir l'utilisation de la plante *Marrubium vulgare* en médecine, il est important de réaliser dans le future d'autre tests confirmatifs (pouvoir antibactérien, antifongique, antioxydant,...), pour une meilleur application dans le traitement de certaines pathologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abderrazak M et Joël R (2007).** La botanique de A à Z. *Ed. Dunod. Paris.* 177p.
- Adzet T., Passet J (1972).** Exposé communiqué à la journée de l'aromatique, chimiotaxonomie du genre *Satureja calamintha*, EPPOS (Luglio), p1-5.
- Al kadi A (1989).** Usage de quelques plantes dans la médecine populaire en Libbie, Vol1-2.
- Aouadhi S (2010).** Mémoire Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle étude de 57 plantes recommandées par les herboristes.
- APG : Angiosperms Phylogeny Group. III (2009).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plantes: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.;* 161: 105-121.
- Archambaud M., (2000).** Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques. *Brulures*, Vol.1.ed. Carr. Méd.
- Audigié C. L., Dupont G., Tonzain F (1995).** (Chromatographie) principes des méthodes d'analyses biochimiques. Tome 1 Doin. 44-85.

B

- Baba Aissa F (1999).** Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb.
- Bardeau F (1976).** La médecine par les fleurs. Ed. Robert Laffont.
- Basil A., Jimenez- Carmona M. M and Clifford A. A (1998).** Extraction of rosemary by super heated water. *Journal of food chemistry*, Vol.46, n°12,p :5205-5209.
- Belaiche P (1979).** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. *Ed. Maloine S.A*, Tome I.
- Bellakhdar J (1997).** Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires, La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. Le Fennecet Ibio Press, impression : *Dunes France*. p 341.
- Benzanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M (1975).** Les plantes dans la thérapeutique moderne. *Maloine S.A. éditeur*.
- Bergogne-Berezin E., Dellamonica P (1995).** Antibiothérapie en pratique clinique. *Ed Masson, Paris*, 486 p.
- Billing J., Sherman P. W (1998).** Antimicrobial function of spices. *Q Rev Biol.* 73: 3-49.
- Boiteau P and Potier P (1980).** alcaloides de *Pandaca retusa.* , *Phytochemistry* 12, 2517-2519.

- Boizot N et Charprntier J.P (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'INRA. pp79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- Bonnier G (1990).** La grande Flore française Ed. Bllin ; Complète. Tome : 09. 25-26.La Végétation de la France, Suisse et Belgique.
- Bosserdet et Rivolier (1977).** Secret et vertus des plantes médicinales. Paris 463p. *Of the Missouri Botanical Garden*, 479-535 p.
- Bouquet A (1972).** Plantes Médicinales du Congo Brazzaville. Ed: O.R.S.T.O.M.
- Bruneton J (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition. Technique et Documentation. *Lavoisier*. Paris.
- Bruneton J (1993).** Pharmacognosie, phytochimie Plantes médicinales, technique et documentation, p.266- 275- 2 ème édition. *Lavoisier*. Paris.
- Brun N (1987).** Biosynthèse des monoterpènes chez les labiées. Rapport bibliographique de D.E.A., université Claude Bernard, Lyon I.

C

- Cantino P. D and Sanders R.W (1986).** Subfamilial classification of Labiateae. *Syst. Bot.* 11: 163-185.
- Chebrouk F (2009).** Caractérisations analytiques de quelques composés polyphénoliques et terpéniques issus de la plante *Marrubium deserti* de la région de Ghardaïa. Magister. Université Kasdi Merbah Ouargla.
- Chen H.Q., Jin Z.Y., Wang X.J., Xu X.M., Deng L., Zhao J. W (2008).** Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neuroscience Letters*. 448 (2) :175-9.
- Chiej R (1982).** Les plantes médicinales. *Ed. Solar*.
- Cohen Y et Jacquot C (2001).** Pharmacologie. 5ème *Ed. Masson. Paris*. 350p.
- Collins M. D., Farrow J. A. E and Jones D (1986).** *Enterococcus mundtii* sp. nov. *tnt. J. Syst. Bacteriol.* 36:8-12.
- Cordelle (1949).** Introduction to alkaloids a biogenetic approach, éd. *Canada*, 1- 1055.
- Cowan M. M (1999).** Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*.12 (4): 564-582.
- Croteau R., Loomis D.W (1973).** Biochemistry and physiology of lower terpenoides. Académie press, *New York*, p 147-182.

Crozier., Einar Jensen., Michael E.J. Lean., Morag and McDonald S (1997). Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 761 315-321.

D

Dacosta Y (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. *Paris*. 317p. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

Daglia M (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 23:1-8.

De Boucherberg M. S., Allegrini J., Bessvere C., Ahisso M., Passet J and Granger R., (1976). Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotype de *Thymus vulgaris Linnalus*. *Rivista Italiana EPPOS*, p 58-527-536.

Debuige G (1984). Larousse des plantes qui guérissent. *Librairie Larousse*.

Delille L (2007). Les plantes médicinales d'Algérie. *Édition BERTI*. Alger, 122.

Domar A and Bourneuf J (1990). Nouveau Larousse médical.

E

Edith A., Robert M and Jean U (1988). Chromatographie: Theorie.26 et 28 Janvier. Lycée Louis Vincent – METZ.

Efendi L and Yajun Y (2008). Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylatedflavonols in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.*8:172-181.

Elqaj M Ahami A et Belghyti D (2007). La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

Émilie Retureau., Cécile Callon., Robert Didienne and Marie-Christine Montel (2010). « Is microbial diversity an asset for inhibiting *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses? », *Dairy Science & Technology*, vol. 90, no 4, p. 375-398.

Encyclopédie des plantes médicinales (2001). Identificatin, préparation, soins, *Larousse*, p 54.

F

- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdely C (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L. organs*, and their biological activities .C. R. *Biologies*. 331: 372-379.
- Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D et Guo Z (1986).** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé.64(2) : 159-164.

G

- Gausсен H et Leroy H. F (1982).** Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2ème Ed : Masson. Paris. 426 p.
- Ghestem A., Seguin E., Paris M and Orecchioni A.M (2001).** Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd *TEC&DOC. Paris*. pp275. (Cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- Grace K. Pereira, Paulo M. Donate, Sergio E., Galembeck E (1996).** Electronic structure of hydroxylated derivatives of the flavylum cation, *Journal of Molecular Structure* (Theochem).
- Grace K., Pereira P M., Donate., Sergio E and Galembeck E (2006).**The Science of Flavonoids, Springer.
- Grayer RJ., Kite GC., Veitch NC., Eckert MR., Marin PD., Senanayake P and Paton AJ (2003).** Leaf flavonoid glycosides as chemosystematic characters in *Ocimum*. *Biochem Syst Ecol*.
- Guignard J. L(1994).** Abrégé botanique, 9 ème édition. *Édition Masson, Paris*.204.
- Guignard J. L (1996).** Biochimie végétale, 10^{ème} éd. *Masson*.
- Guignard J. L (2001).** Biochimie végétale. 2ème Ed. De l'abrégé *Dunod, Paris*, pp.177-185.

H

Harborne et Williams C.A (2000). Anthocyanins and other flavonoid. Naturel product reports 15,631-652.

Henri V (1993). Mes procédés d'extraction des huiles essentielles. Partie 1, D'après des articles de Henri Viaud, distillateur thérapeutiques naturelles, GNOMA.

Heywood V. H., Brummitt R. K., Culham A and Seberg O (2007). Flowering Plant Families of the World. Kew Publishing, Richmond.

I

Iserin P (2001). Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse VUEF, 2^{ème} Ed., Paris : 14, 275.

J

Johnson G. L., Hoger J. H., Ratnayake J. H and Anderson J. S (1984). "Characterization of three intermediates in the biosynthesis of teichuronic acid of *Micrococcus luteus*," Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 235, no. 2, pp. 679–691.

Jones W.P., Kinghorn A.D., (2005). Extraction of plant secondary metabolites. Natural products isolation. Humana Press (Totowa). pp: 323-411.

Judd Walter S., Campbell Christopher S., Kellogg Elizabeth A., Stevens Peter (2002). Botanique Systématique, une perspective phylogénétique. *Edition De Boeck Université* ,84 –87 ,396-399.

K

Kamagate., Kone D., Coulibaly N.T., Brou E and Sixou M (2001). Etude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques. *Ordo-Stomatologie tropical*. N° 95.

Kansole M.M.R (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin).

Kaufmann S. H. E (1997). Host response to intracellular pathogens. New York. 345 p.

Khanbabae K and Ree T.R (2001). Tannins: Classification and Definition. *Journal of Royal Society of Chemistry*. 18: 641-649. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

King A and Young G (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*. 99:213-218. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

Kirrmann J., Cantacuzene P., Duhamel (1975). Chimie organique fonctions complexes, tome 3, éd. *Librairie Colin. Paris*, p:197- 199.

L

Legrand G (1978). Manuel préparatoire en pharmacie. 8^{ème} éd. *Masson*.

Lemberg S (1982). « Armoise » *Artémisia herba alba. parfumer flavorist*, 7, p 58-63.

Luc De Cooma, Flavonoid biosynthesis in petals of *Rhododendron Simsii*.

Lugasi A., Hovari J., Sagik and Biro L (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J.Acta.biologica. szegediensis*. 47 (1 4):119-125. (Cited in Mohammedi Z, 2005).

Luiga Longo, Giuseppe Vasapallo (2006). Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera L. berries*, *Food Chemistry*. 226–231.

Lutge U., Kluge M and Bauer G (2002). Botanique 3^{ème} Ed : Technique et documentation. *Lavoisier Paris*. 211p.

M

Marfak A (2003). Radiolyse gamma des flavonoides: Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. Thèse de doctorat. Universités de Limoges, pp. 24-42.

Martin S and Andriantsitohaina R (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angiologie*. 51: 304-315.

Monsen T, Rönmark M, Olofsson C, Wiström J., (1998). An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 17:327-335.

Mori A., Nishino C., Enoki N., Tawata S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 26: 2231-2234.

Moussaid M., Elamrani A.A., Berhal C., Moussaid H., Bourhim1 N., Benaissa M., (2012). Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family: *Marrubium vulgare* (L.) and *Origanum majorana* (L.). *International Journal of Natural Products Research*. 1 (1) : 11-13.

N

Nair R and Chanda S (2005). Anticandidal activity of *Punica granatum* exhibited in different solvents. *Pharmaceutical Biology*. 43: 21-5.

Nauciel C and Vildé J. L (2005). Bactériologie médicale, 2ème Ed. *Masson. Paris*. pp: 5-10.

Novak, I. Buzas, G.; Minker, E.; Kolfai, M. et Szendrei, K. Planta med., (1966). Untersuchung der wirkstoffe der *Rutagraveolens* II. *Planta Medica*, 14, p: 57.

P

- Padrini F and Lucheroni M.T (1996).** Le grand livre des huiles essentielles. Ed. *De Vecch.*
- Patrick B., Jean L., and Michel S (1988).** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1er Ed *Médecine –Sciences Flammarion.* Paris. pp: 100-108-274.
- Paris M et Hurabielle (1981).** Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. *Ed M Paris R., 1954. B rill. Suc. B Dt.,* 101, p. 457.*Masson.* Paris.pp: 102-103-104-107.
- Paris M M and Hurabielle (1986).** Abrégé de matière médicale, tome 2, éd. *Masson,* 256-266.
- Pelt J.M (2001).** Les nouveaux actifs naturels. *Marabout. Paris.* 219-124.
- Perrin A and Colsan M (1983).** L'appareil sécréteur chez les menthes : modalité de stockage des essences dans les glandes à tête pluricellulaire. Acte du colloque : Les menthes en France, aspect scientifique, économique et industriel. Université Claude Bernard, Lyon I.

Q

- Quezel P., Santa S (1963).** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In: *CNRS (Ed.),* Vol. 1-2. Paris.
- Quezel P (1978).** Analyses of the flora Mediterranean and Saharan Africa.*Annals.*

R

- René L (2002).** Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>.
- Ribereau-Gayon P (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. *Dunod. Paris.*
- Richard C et Kiredjian M (1995).** Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts: *Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium,*

Acinetobacter, Brucelle, Bordetella. 2ème édition. Ed Institut. Pasteur .Paris. pp: 42-43.

S

- Sandhar H.K., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., Sharma P (2011)**. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *International Pharmaceutica Scientia*. 1 (1): 25-41.
- Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I., (2005)**. Natural products isolation. Humana Press (Totowa). Pp: 1-23.
- Scalbert A (1991)**. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30: 3875-3883.
- Schlempher V (1996)**. « Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues » *Phytomedecine*, 3 (2), 211-216.
- Seidel V., (2005)**. Initial and Bulk Extraction. Natural products isolation. Humana Press (Totowa). pp: 27-37.
- Seyoum A., Asres K., and El-Fiky F.K (2006)**. Structure– radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. 67: 2058–2070.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M (1999)**. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. Orlando Academic Press: 152-178.
- Solfo R.R (1973)**. Etude d'une Plante Médicinale Malgache *Buxus madagascariensis* Bail et ses Variétés. Ed : O.R.S.T.O.M.
- Sowunmi S., Ebewele R.O and Peters C.A.H (2000)**. Differential scanning calorimetry of hydrolysed mangrove tannin, *Ed Polym Int Polymer International*. 49: 574-578.
- Spichiger R.E (2000)**. Botanique systématique des plantes à fleurs. 3ème édition. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
- Steven P., Rachel. C., Martha E., Paul. H., Jane S and Peter W.J (2004)**. Microbiology of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press. pp71-132.

Stobiecki M., Skiryecz A., Kerhoas L., Kachlicki P., Muth D., Einhorn J and Mueller B., (2006). Roeber, Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of *Arabidopsis thaliana* using LC/MS, *Metabolomics*.197-219.

T

Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G and Mathé G (2002). Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed. pharmacother.* 56: 200-207. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

U

Ulukanli Z., Akkaya A., (2011). Antibacterial Activities of *Marrubium catariifolium* and *Phlomis pungens* Var. *Hirta* Grown Wild in Eastern Anatolia, Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology.* 13 : 105-109.

V

Vallet (1996). Contribution à l'étude de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill, transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* et culture de *Chevelus lacunaires*, mémoire D.E.A. Université de Picardie Jules Vienne, 1 – 32.

Valnet J (1984). Aromathérapie- Traitement des maladies par les essences des plantes. Ed. *Maloine S.A.*, n°10.

Volak J and Stodola J (1983). Les plantes médicinales. éd. Gründ, Paris, pp.29 – 53

Verpoorte R (2002). La pharmacognosie du nouveau millénaire: pistes et biotechnologies. Des sources du savoir aux médicaments du futur, 4^o congrès européen d'ethnopharmacologie. *IRD Ed: Paris*, 274 p.

Vitor R.F., Mota-Filipe H and Teixeira G (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology.* 93 (23): 363-70.

W

Weel K.G.C (1999). « Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare L.*) grown in Lithuania, *Fett/Lipid* 101, 10, 395 – 400.

Wichtl M and Anton R (1999). Plantes thérapeutiques : tradition pratique, officinale, science et thérapeutique. *Ed. Tech. et doc.*

Wichtl M and Anton R (2003). Plantes thérapeutiques : Traditions, Pratique officinale, Sciences et Thérapeutique. 2^e Ed : *TEC & DOC. Paris.* pp. 1-364.

ANNEXES

Annexe 1

a. Recherche des Saponosides

La mousse persistante est proche de 1cm dans le 7eme tube alors :

$$I = 9\text{cm} \times 5 / 0,07$$

$$I = 642,8$$

L'indice est supérieur de 100 ce qui confirme la présence des saponosides.



Figure1 : La mise en évidence des saponosides.

b. Recherche des anthocyanes

Le changement de la couleur indique la présence des anthocyanes.

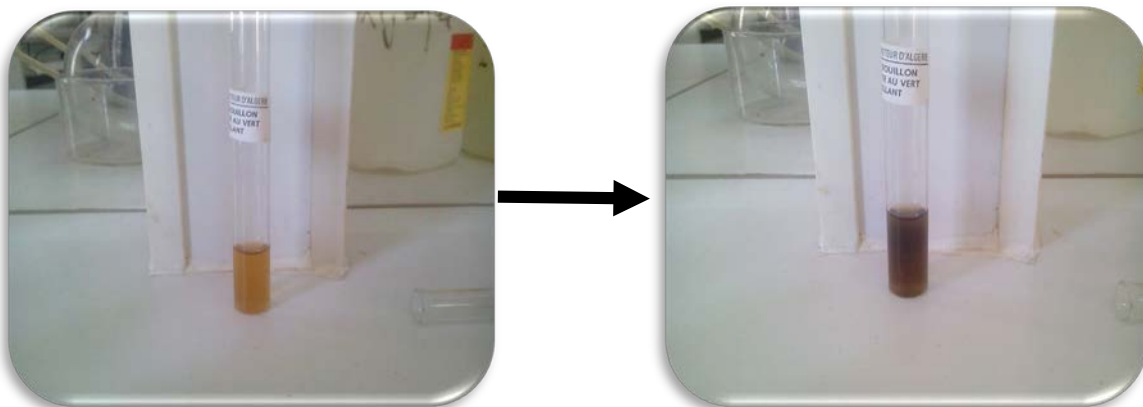


Figure 2 : Présence des anthocyanes.

c. Recherche des cardinolides

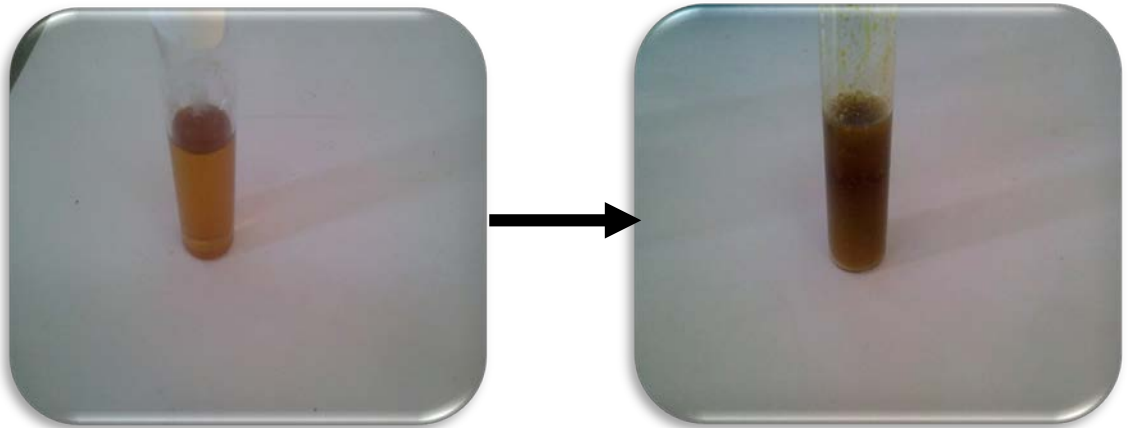


Figure 3 : L'absence des cardinolides.

d. Recherche des flavonoïdes



Figure 4 : La présence de la couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence des flavonoïdes.

e. Recherche des alcaloïdes



Figure 5 : Absence des alcaloïdes.

Annexe 2

La courbe d'étalonnage

Tableau 1 : L'absorbance des différentes concentrations de l'acide gallique

C	0	10	40	50	80	90	100	120	150	200	250	300
ABS	0	0,031	0,123	0,161	0,278	0,302	0,33	0,4	0,502	0,67	0,873	1,12

Annexe 3

Séparation des flavonoïdes par CCM

$$RF = x/y$$

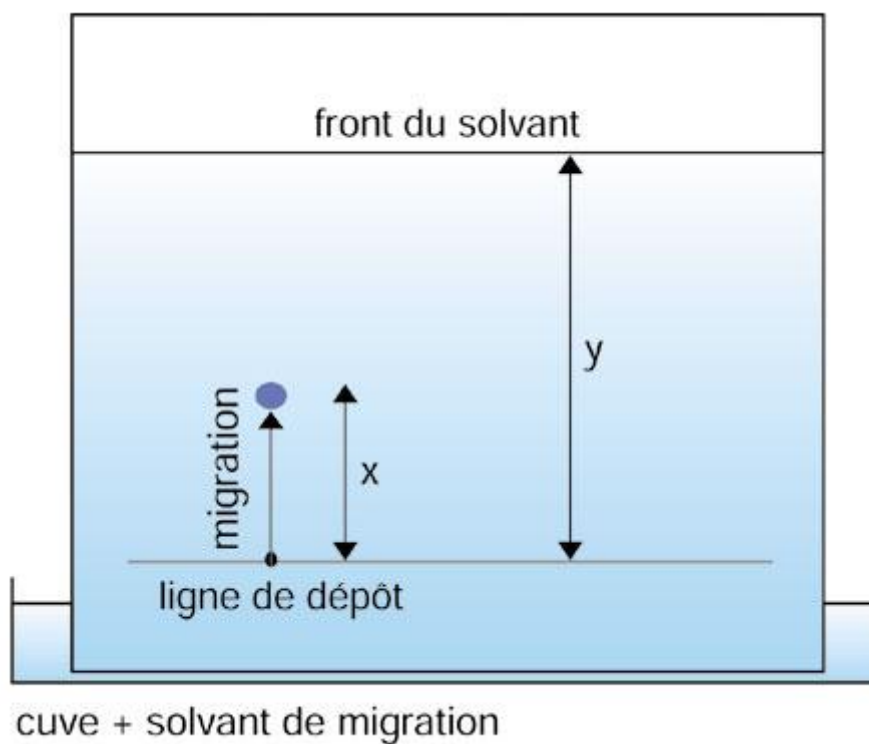


Figure 6 : Calcule des rapports frontaux.

Tache 1

$$RF = 2,7 / 4,6 = 0,59$$

Tache 2

$$RF = 3,6 / 4,6 = 0,78$$

Annexe 4

Milieu MH (Muller Hinton)

Extrait de viande 3g

Hydrolysate acide de caséine 17,5g

Amidon 1,5g

Agar 16g

pH 7,3(+/-0,2)

Milieu MRS (De Man *et al.*, 1960)

Extrait de levure 4,00g

Extrait de viande 8,00g

Peptone 10,00g

Acétate de sodium 5,00g

Citrate d'ammonium 2,00g

Glucose 20,00g

Phosphate dipotassique (K_2HPO_4) 2,00g

Sulfate de magnésium ($MgSO_4$) 0,25g

Sulfate de manganèse ($MnSO_4$) 0,05

Tween 80 1,00 ml

Agar-agar 20,00 g

Eau distillée 1000,00 ml

pH = 6,8

Stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 20 minutes.

Résumé

Marrubium vulgare L est une plante médicinale recensée auprès des populations végétales, reconnu par son intérêt thérapeutique, une étude phytochimique a été réalisé afin d'apporter preuves de son efficacité et d'élargir son utilisation dans les domaines chimiques et biologiques pour des fin chimique en médecine, vu son pouvoir antimicrobien et antioxydant. Les analyses effectuées ont permis d'isoler un des principaux métabolites secondaires, les flavonoïdes. L'analyse par CCM a révélé la présence des flavonoïdes dans l'extrait isolé à partir des feuilles. Les tests préliminaires mis en évidence certains métabolites secondaires comme les tanins catéchiques, les saponosides, les anthocyanes, les terpènes et stérols et les flavonoïdes, la teneur de ces derniers est de 8.6% dans l'extrait obtenue à partir des feuilles de la plante étudiée. Les tests de l'activité antibactérienne ont montrés la puissance antibactérienne des flavonoïdes, l'effet bactéricide varie selon la nature de la souche et de la substance testée.

Mots clés : *Marrubium vulgare L*, les flavonoïdes, CCM, pouvoir antimicrobien.

ABSTRACT

Marrubium vulgare is an herbal found among populations, recognized by its therapeutic interest, a phytochemical study was conducted to provide evidence of its effectiveness and to expand its use in the chemical and biological fields for chemical purposes in medicine, regarding to its antimicrobial and antioxidant power.

Analyses were used to isolate one of the main secondary metabolites, flavonoids. CCM analysis revealed the presence of flavonoids in extract isolated from the leaves.

Preliminary tests showed some secondary metabolites such as catechiques tannins, saponins, anthocyanins, terpenes and sterols and flavonoids, the content of these is about 8.6% in the extract obtained from the leaves of the plant studied.

The antibacterial activity tests have shown the antibacterial power of flavonoids, the bactericidal effect varies with the nature of the strain and the substance tested.

Keywords: *Marrubium vulgare*, flavonoids, CCM, antimicrobial power.