

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur
et de la recherche scientifique
Université Mouloud Mammeri

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي.

جامعة مولود معمري

FACULTE DE MEDECINE
TIZI-OUZOU
Département de pharmacie



كلية الطب
تيزي وزو
قسم الصيدلة

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté sous forme d'article et soutenu publiquement
en vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie

Le : 12 / 06 / 2024

Sous le thème

**Contribution à l'étude pharmacognostique du *Marrubium vulgare*L.
essais botaniques, phytochimiques et biologiques.**

Réalisé par : AKLI Yasmine
GUEBBAL Yasmine
KACEL Soraya
MANSOURI Yasmine

Encadré par : Dr BERIALA
Hadjer Nour El Imane

Membres de jury :

Dr. LOUEDJ. L	Chargé de cours UMMTO	département de Pharmacie	Président
Pr. DAHMOUNE. A	MCA en botanique médicale et cryptogamie UMMTO	département de Pharmacie	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2023/2024

Résumé :

Introduction : *Marrubium vulgare L.* est une lamiacée très répandue dans le pourtour méditerranéen, connue par sa richesse en métabolites secondaires notamment en polyphénols, qui sont à l'origine de diverses propriétés biologiques telles que l'activité antioxydante. Notre étude vise principalement à évaluer l'activité antioxydante des parties aériennes du Marrube blanc et secondairement, l'identification de la plante sur le plan botanique, phytochimique ainsi que l'évaluation de sa richesse en composés phénoliques.

Matériel et méthodes : un examen botanique macroscopique et microscopique a été effectué, suivi d'un screening phytochimique à la recherche des métabolites primaires et secondaires. Un extrait hydrométhanolique a été préparé à l'aide d'un Soxhlet, suivi d'un fractionnement par l'acétate d'éthyle et le chloroforme pour déterminer leurs teneurs en composés phénoliques par spectrophotométrie UV-visible et évaluer leur activité antioxydante par la méthode de DPPH et FRAP.

Résultats : l'étude botanique macroscopique de la plante a montré que les feuilles sont simples, pétiolées avec un aspect duveteux, tandis que l'examen microscopique a révélé la présence de structures propres aux lamiacées. Le screening phytochimique a démontré la présence de plusieurs composés : protéines, lipides, sucres réducteurs, saponosides, stéroïdes, alcaloïdes, hétérosides cardiotoniques et composés phénoliques (flavonoïdes, tanins, polyphénols). Le dosage des composés phénoliques dans les deux extraits a indiqué que l'extrait chloroformique est plus riche en flavonoïdes et tanins que l'extrait acétate d'éthyle avec des concentrations de 0.118 ± 0.013 mg ER/gDS, 0.538 ± 0.022 mg EC/gDS contre 0.103 ± 0.011 mg ER/gDS, 0.034 ± 0.008 mg EC/gDS respectivement. Cependant, l'extrait acétate d'éthyle est plus riche en polyphénols avec une concentration de 0.074 ± 0.008 mg EAG/gDS versus 0.021 ± 0.05 mg EAG/gDS. Concernant l'activité antioxydante, l'extrait acétate d'éthyle a présenté un meilleur pouvoir antioxydant par rapport au deuxième extrait avec une concentration inhibitrice 50 de l'ordre de $82.54 \mu\text{g/ml}$ versus $1388.32 \mu\text{g/ml}$ respectivement par la méthode de DPPH et une valeur de CI50 de l'ordre de $4144.97 \mu\text{g/ml}$ contre $38370.38 \mu\text{g/ml}$ respectivement par la méthode de FRAP.

Conclusion : cette étude permet de confirmer l'intérêt de l'espèce *Marrubium vulgare L.* Comme source de composés phénoliques qui pourraient être exploités pour leur activité antioxydante en industrie. Afin de compléter cette recherche, il serait pertinent d'évaluer d'autres activités biologiques que ce soit in vivo ou in vitro et d'étudier la toxicité aiguë, subaiguë et chronique de ces composés.

Mots -clés : *Marrubium vulgare L.*, composés phénoliques, Soxhlet, solvants de polarité croissante, activité antioxydante, étude des activités biologiques in vivo.

Abstract:

Introduction: *Marrubium vulgare L.* is a lamiaceae widely grown around the Mediterranean coast, known for its secondary metabolite's richness, notably polyphenols, which are responsible for various biological properties such as antioxidant activity. The main aim of our study is to assess the antioxidant activity of White horehound aerial parts, and secondarily, to identify the plant botanically and phytochemically, and assess its phenolic compound content.

Material and methods: macroscopic and microscopic examination was carried out, followed by phytochemical screening for primary and secondary metabolites. A hydromethanolic extract was prepared using a Soxhlet, followed by fractionation with ethyl acetate and chloroform to determine their phenolic compound contents by UV-visible spectrophotometry and evaluate their antioxidant activity by the DPPH and FRAP method.

Results: macroscopic examination of the plant revealed simple, petiolate leaves with a downy appearance, while microscopic examination revealed the presence of structures typical of Lamiaceae. Phytochemical screening showed the presence of several compounds: proteins, lipids, reducing sugars, saponosides, steroids, alkaloids, cardiotonic heterosides and phenolic compounds (flavonoids, tannins, polyphenols). The determination of phenolic compounds in both extracts indicated that the chloroform extract was richer in flavonoids and tannins than the ethyl acetate extract, with concentrations of 0.118 ± 0.013 mg ER/g DS, 0.538 ± 0.022 mg EC/g DS versus 0.103 ± 0.011 mg ER/g DS, 0.034 ± 0.008 mg EC/g DS respectively. However, the ethyl acetate extract was richer in polyphenols with a concentration of 0.074 ± 0.008 mg EAG/g DS versus 0.021 ± 0.05 mg EAG/g DS. Concerning the antioxidant activity, the ethyl acetate extract showed a better antioxidant power compared to the second extract with an inhibitory concentration 50 of $82.54 \mu\text{g/ml}$ versus $1388.32 \mu\text{g/ml}$ respectively by the DPPH method, and an IC₅₀ value of $4144.97 \mu\text{g/ml}$ versus $38370.38 \mu\text{g/ml}$ respectively by the FRAP method.

Conclusion: this study confirms the interest of the *Marrubium vulgare L.* species as a source of phenolic compounds that could be exploited for their antioxidant activity in industry. To complete this research, it would be relevant to evaluate other biological activities, both in vivo and in vitro, and to study the acute, sub-acute and chronic toxicity of these compounds.

Keywords: *Marrubium vulgare L.*, polyphenols components, Soxhlet, solvent of increasing polarity, antioxidant activity, study of biological activities in vivo.

I. Introduction

Les plantes médicinales étaient considérées comme remèdes naturels pour lutter contre différentes maladies et continuent toujours à servir de source majeure de produits pharmaceutiques actuellement [1]. Actuellement, 50 % de molécules mises sur le marché pharmaceutique pour le traitement des cancers sont extraites de végétaux ou de préparations à base de plantes [2]. En Algérie, une étude menée dans 70 officines a recensé 43 médicaments à base de plantes dont la plupart appartiennent à la famille des lamiacées [3].

Le *Marrubium vulgare* L. a attiré l'attention des chercheurs pour ses vertus médicinales intéressantes. C'est une herbacée, vivace qui appartient à la famille des lamiacées, avec une tige quadrangulaire dressée très duveteuse à l'origine des termes anglais « har » et « hune » qui signifient plante duveteuse [4]. C'est une plante cosmopolite, originaire d'Europe méridionale, répandue un peu partout dans l'hémisphère nord et surtout dans le pourtour méditerranéen [5]. En Algérie, parmi les 06 espèces recensées du genre *marrubium*, *Marrubium vulgare* L. est la plus communément distribuée sur le territoire national, et notamment en Kabylie où elle est retrouvée à l'état sauvage et cultivée par la population locale pour ses vertus thérapeutiques [6].

Nombreuses études ethnobotaniques menées en Algérie ont montré que les parties aériennes du Marrube blanc sont utilisées sous forme de décoction, infusion [7] dans le traitement de la toux, des infections respiratoires, du rhumatisme, l'hyperglycémie, l'hypertension artérielle et de divers troubles gastro-intestinaux tels que les ballonnements, flatulence [8][9]... De plus, certains usages traditionnels ont été confirmés par des recherches modernes et des essais cliniques notamment pour son activité sur le diabète type 2, un essai clinique mené sur 21 personnes a montré la capacité d'extraits aqueux de *Marrubium vulgare* L. à réduire les niveaux du glucose, triglycérides et cholestérol dans le plasma [10]

De point de vue phytochimique, le Marrube blanc est riche en métabolites secondaires de nature terpéniques, entre autres des mono et sesquiterpènes qui constituent la fraction volatile de l'huile essentielle, des diterpènes, en particulier, la diterpène lactone (marrubiine) qui peut être considérée comme un marqueur chimiotaxonomique. Des analyses chromatographiques des extraits des parties aériennes de Marrube blanc ont permis l'identification de nombreux composés phénoliques dont une série d'esters de phénylpropanoïdes et leurs dérivés [11] et des polyphénols en particulier, les flavonoïdes lutéoline, apigénine, crysoeriol-O-glucuronide, ladanein, amentoflavone, c-cirsimaritine et les tanins comme l'acide gallique [11–13].

Récemment, un grand intérêt s'est porté sur les composés phénoliques d'origine végétale, car ils constituent une source naturelle d'antioxydants utilisée dans la lutte contre le stress oxydant qui est décrit comme un

facteur étiologique crucial impliqué dans diverses maladies chroniques humaines telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, inflammation, le diabète sucré et le vieillissement[14].

Le stress oxydant est dû à la production de radicaux libres qui provoquent des dommages oxydatifs par l'attaque de diverses biomolécules en particulier, les protéines, les lipides et l'ADN, entraînant finalement la dégradation et la mort des cellules. Les composés phénoliques sont capables de chélater les ions métalliques impliqués dans la génération d'espèces réactives d'oxygène (ROS) ou de piéger les radicaux libres et de former des structures intermédiaires stables limitant ainsi l'initiation ou la propagation des radicaux libres, d'où leur intérêt comme nutraceutiques et/ou additifs alimentaires pour protéger les denrées et ralentir le processus d'oxydation[15].

Dans ce contexte vient la contribution de cette étude dans la valorisation de la flore végétale locale et l'étude expérimentale de notre espèce algérienne de *Marrubium vulgare* comme source de composés phénoliques.

Ce travail vise comme objectif principal à évaluer l'activité antioxydante des parties aériennes de Marrube blanc par des méthodes in vitro et de réaliser comme objectifs secondaires : l'identification de cette plante sur le plan botanique et phytochimique ainsi que le dosage des composés phénoliques des parties aériennes de cette plante.

II. Matériels et Méthodes

1. Matériel végétal

Nous avons fait la récolte de la plante du Marrube blanc (*Marrubium vulgare*L.) au mois d'octobre 2023 dans la région de Maâtkas, située à 25.4 Km de Tizi-Ouzou et à 108 Km d'Alger, Algérie.

Les parties aériennes ont été séchées à l'ombre, durant 2 semaines dans un endroit bien aéré, et à température ambiante, pour préserver au maximum l'intégrité des molécules.

Nous avons fait l'identification de la plante au niveau du laboratoire de pharmacognosie du département de pharmacie de la faculté de médecine de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

2.Méthode d'extraction

Nous avons utilisé une méthode d'extraction en continue grâce à l'extracteur Soxhlet.

Nous avons procédé tout d'abord par une délipidation de la plante sèche afin d'éliminer les lipides qui peuvent interférer durant notre analyse ,pour cela,20 g du matériel végétal sont introduits dans une cartouche en cellulose fixée sur un ballon qui contient le solvant d'extraction qui est l'hexane à raison de 250ml ,surmonté

d'un réfrigérant, l'ensemble est placé sur une source de chaleur qui permet le chauffage du solvant qui va s'évaporer, condenser dans le réfrigérant et puis tomber dans l'extracteur au contact direct avec le matériel végétal qui lui permet d'extraire les lipides et qui prend ainsi une couleur verte, ce dernier est régulièrement pompé dans l'extracteur par l'intermédiaire d'un siphon afin de rejoindre le solvant d'extraction et crée ce qu'on appelle un cycle d'extraction. La délipidation est terminée après plusieurs cycles d'extraction (après 4 à 6 heures), quand le solvant sortant de la chambre d'extraction du soxhlet via le siphon, reprend sa couleur initiale, ce qui signifie que la plante a été épuisée des substances lipophiles à extraire.

Ensuite, nous avons réalisé une extraction hydrométhanolique en suivant le même protocole que la délipidation en utilisant 20g de la plante délipidée précédemment et un mélange eau/méthanol(85%) comme solvant d'extraction [16]. En effet, le méthanol permet d'avoir un bon rendement d'extraction et il représente un solvant permettant la dissolution de la majorité des composés phénoliques[17,18].

Les extraits hydrométhanoliques obtenus après extraction ont subi une évaporation du méthanol à l'aide d'un rotavapor et la phase aqueuse restante après l'évaporation du méthanol a subi une extraction liquide liquide à l'aide de solvants de polarité croissante : le chloroforme et l'acétate d'éthyle. A la fin de l'extraction, les extraits organiques ont subi une évaporation sous vide par un évaporateur rotatif [19].

3. Étude botanique

a) Examen macroscopique

Les feuilles de *Marrubium vulgare* L., ont été examinées à l'œil nu et à la loupe monoculaire afin d'observer les caractéristiques morphologiques et organoleptiques[19].

b) Examen microscopique

Cet examen a pour but la visualisation des caractères anatomiques et histologiques des feuilles de *Marrubium vulgare* L. en effet, après avoir été conservées dans un mélange à volume égal d'alcool, de glycérine et d'eau distillée, les feuilles ont été coupées transversalement à l'aide d'une lame de rasoir. Ensuite, elles ont été colorées par la méthode de double coloration qui implique à tremper successivement ces coupes dans de l'eau de javel (20 minutes) pour détruire le contenu cellulaire, puis dans l'acide acétique à 1% (5 minutes) qui permet la fixation des colorants, suivi par la coloration avec le vert d'iode (30 secondes à 1 minute) qui a une sélectivité pour les tissus lignifiés et par conséquent, prennent une couleur verte, puis du rouge congo (5 minutes) qui possède une sélectivité pour les tissus vivants et les colore en rouge, avec un rinçage à l'eau distillée après chaque étape.

Après coloration, les coupes transversales ont été montées entre lame et lamelle avec de la glycérine puis analysées au microscope photonique au grossissement Gx10 et Gx40.

La pulvérisation des feuilles sèches a été faite à l'aide d'un broyeur afin d'obtenir une poudre, qui a été ensuite montée entre lame et lamelle avec le réactif de Gazet du Chatelier pour être examinée au microscope optique (Gx10 et Gx40) [19].

4. Étude phytochimique

4.1 Analyse qualitative

Les différents types d'extraits des feuilles délipidées ont été soumis à divers tests phytochimiques en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques qu'ils contiennent, en utilisant la méthode standard basée sur des réactions de coloration et de précipitation. A cet effet, plusieurs types de réactifs ont été utilisés. [19,20].

Recherche des sucres réducteurs par la réaction de Fehling : Elle repose sur la capacité des sucres comme le glucose et le fructose à réduire les ions cuivreux (Cu^{2+}) présents dans le réactif de Fehling A (sulfate de cuivre), en présence de réactif de Fehling B (tartrate double de sodium et de potassium) qui agit comme un complexant qui stabilise les ions cuivreux en solution. Lorsque l'extrait testé est chauffé avec ces réactifs, les sucres réducteurs réduisent les ions cuivreux (Cu^{2+}) en (Cu^+), formant un précipité d'oxyde de cuivre(I), Cu_2O de couleur rouge brique.

Dans un tube à essai, nous avons mélangé l'extrait aqueux de la poudre des feuilles délipidées avec des volumes égaux de réactif de Fehling A et de Fehling Agité puis chauffé pendant 10 minutes. La formation d'un précipité rouge brique indique la présence de sucres réducteurs.[21]

Recherche des polysaccharides : Les mucilages sont des polysaccharides solubles dans l'eau, qui ont tendance à former des flocons lorsqu'ils sont mélangés avec de l'éthanol qui réduit leur solubilité dans l'eau, ce qui provoque leur précipitation.

Dans un tube à essai, nous avons ajouté 5 ml d'éthanol à 1 ml de l'extrait hydroalcoolique. La formation d'un précipité floconneux est un signe positif de la présence de mucilages dans l'extrait[22]

Recherche des protides : par 2 réactions :

Réaction de Biuret : permet la détection de liaisons peptidiques dans les protéines par la formation d'un complexe violet entre les atomes d'azote de ces liaisons et les ions cuivreux (Cu^{2+}) en milieu alcalin.

Dans un tube à essai, nous avons ajouté une solution de sulfate de cuivre à 0.1% goutte à goutte à un mélange qui contient l'extrait alcoolique de la poudre des feuilles délipidées et le NAOH à 10 %.Le test est positif lorsqu'une couleur violet apparaît.[23]

Réaction à la Ninhydrine : la ninhydrine permet la détection des acides aminés libres ainsi que leurs résidus en réagissant avec leurs groupes amines primaires, produisant ainsi des composés colorés.

Dans un tube à essai, nous avons mis à ébullition un extrait alcoolique de la poudre des feuilles délipidées en présence de la ninhydrine à 0.25 % .le test est positif par l'apparition d'une coloration violette-bleue[24].

Recherche des lipides :

Réaction au soudan III : Le Soudan III est un colorant liposoluble qui pénètre dans l'échantillon et se dissout dans les structures contenant des lipides leur conférant ainsi sa coloration.

Sur un papier chromatographique, nous avons déposé une goutte d'un extrait hexanique en présence d'un témoin négatif (hexane) puis immergé dans le réactif de soudan III pendant 15 minutes puis rincé abondamment à l'eau distillée et séchée. L'apparition d'une couleur rouge atteste la présence de lipides.[25]

Recherche des hétérosides cardiotoniques :

Après traitement de l'extrait hydro alcoolique avec l'acétate basique du plomb, il a été filtré et la solution résultante a été agitée avec du chloroforme , ce dernier a subi ensuite une évaporation[26].

Les réactions suivantes ont été effectuées sur le résidu d'évaporation de la phase organique :

- **Réaction de Liebermann :** c'est une réaction spécifique au noyau stéroïdien de la génine. Dans un tube à essai, nous avons traité le résidu d'évaporation avec quelques gouttes de l'acide sulfurique et quelques gouttes d'anhydride acétique. Le test est positif lorsqu'une couleur rouge brun qui vire au vert olive apparaît.
- **Réaction de Baljet :** c'est une réaction spécifique au noyau cardénolide. Dans un tube à essai, nous avons traité le résidu d'évaporation avec quelques gouttes de la soude à 10% et d'acide picrique à 1%. Le test est positif lorsqu'une coloration rouge orangé stable apparaît.
- **Réaction de Kedde :** c'est une réaction spécifique au noyau cardénolide. Dans un tube à essai, nous avons traité le résidu d'évaporation avec quelques gouttes de la soude à 10% et d'acide dinitro-3,5-benzoïque à 1%. Le test est positif lorsqu'une coloration rouge violacée stable apparaît.

- **Réaction de Raymond Marthod** : c'est une réaction spécifique au noyau cardénolide. Dans un tube à essai, nous avons traité le résidu d'évaporation avec quelques gouttes de la soude à 10% et 1-3 Dinitrobenzène à 1%. Le test est positif lorsqu'une coloration bleu violacé fugace apparaît.
- **Réaction de killer killiani** : c'est une réaction spécifique des 2,6-didésoxyhexoses (partie osidique). Dans un tube à essai, nous avons traité le résidu d'évaporation avec le H₂SO₄(c), et l'acide acétique(c) en présence de traces de FeCl₃ à 2 %. Le test est positif lorsqu'un anneau brun rouge se forme et la solution acétique se colore en vert.

Recherche des quinones libres :

Dans un milieu alcalin, les quinones ont la capacité de réagir avec des phénols ou des amines pour donner des complexes colorés.

Nous avons mis 0,15 grammes des parties aériennes de la plante à macérer dans un erlen pendant quelques minutes avec 2 ml du chloroforme. Ensuite, nous avons filtré, récupéré la phase chloroformique dans un autre tube auquel nous avons ajouté 1ml d'ammoniaque officinal. Puis nous avons agité l'ensemble.

L'apparition d'une couleur allant du rouge au violet indique une réaction positive[27].

Recherche des terpénoïdes :

- **Réaction de Liebermann** : permet la caractérisation du noyau stéroïdien. Dans un tube à essai le résidu d'évaporation a été traité avec quelques gouttes de l'acide sulfurique et quelques gouttes d'anhydride acétique. L'apparition d'une couleur rouge brun qui vire au vert olive indique une réaction positive.[26]
- **Recherche des alcaloïdes** : Les alcaloïdes précipitent sous l'action de certains réactifs appelés « les réactifs généraux des alcaloïdes ».

Cette réaction est fondée sur leur capacité à se combiner aux métaux lourds (Bismuth, Mercure, Iode...) en milieu aqueux légèrement acide, Il en existe plusieurs types, tels que :

- Réactif de Mayer (tétra-iodomercurate de potassium)
- Réactif de Dragendorff (tétra iodobismuthate de potassium)
- Réactif de Bouchardât (Iodo-iodurée de potassium)

Nous avons alcalinisé une quantité de 5g de la drogue par une solution de bicarbonate de sodium à 5% jusqu'à Ph=9, puis macéré avec 40ml du chloroforme. L'ensemble a été agité pendant 5 minutes puis filtrer.

Le filtrat a été versé dans une ampoule à décanter avec l'ajout du HCl à 5% goutte à goutte jusqu'à Ph=3. L'ensemble a été agité pendant 10 minutes en dégazant de temps en temps. La phase aqueuse acidifiée a été récupérée sur 3 tubes sur lesquels nous avons effectué les réactions générales des alcaloïdes[28].

Dans le cas de présence de ces derniers, l'addition de 2 gouttes du réactif de Dragendorff provoque un précipité rouge orangé. L'ajout de 2 gouttes du réactif de Boucardât provoque un précipité de coloration brun-rougeâtre. L'addition de 2 gouttes du réactif de Mayer provoque un précipité blanc[29].

➤ **Recherche des saponosides :**

Les saponosides possèdent des propriétés amphiphiles leur permettant d'agir comme des agents tensioactifs, capables de réduire la tension superficielle de l'eau et de former des micelles, entourant les graisses et les huiles permettant ainsi de les solubiliser dans l'eau en produisant une mousse stable.

Un décocté aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare*L. à 1% a été dilué dans une série de 11 tubes à essai calibrés (de 16 cm de haut et 16 mm de diamètre). Nous avons successivement introduit 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml de décocté dans chaque tube, complétant ensuite chacun à 10 ml avec de l'eau distillée. Chaque tube a été agité longitudinalement pendant 15 secondes, à raison de 2 agitations par seconde. Après un repos de 15 minutes, nous avons mesuré la hauteur de la mousse dans chaque tube. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides[30].

Recherche des composés phénoliques :

Recherche des flavonoïdes :

- **Réaction au trichlorure ferrique :** permet la caractérisation des polyphénols par la formation de complexes colorés avec les métaux, tels que le fer.

Dans un tube à essai, nous avons ajouté quelques gouttes du réactif FeCl₃ à 2 % à l'extrait hydroalcoolique. Lorsque la solution exhibe une couleur bleu-vert, cela confirme un résultat positif au test[31].

- **Réaction à la cyanidine :** permet de caractériser les flavonoïdes au sens strict en formant des produits anthocyaniques colorés. Cela se fait par la réduction des génines flavonoïdiques grâce à l'hydrogène généré par l'utilisation d'un métal (magnésium) dans un milieu fortement acide (HCl).

Nous avons déposé 2 ml de l'extrait hydroalcoolique dans un tube, plongé dans un b cher rempli d'eau froide, puis nous les avons traités avec 1 ml d'eau distillée, 1ml d'acide chlorhydrique concentré et une quantité de magnésium. Lorsque la solution prend une teinte orange, cela signifie que le test est positif[31].

➤ **Réaction au trichlorure d'aluminium** : permet la caractérisation des flavono ides au sens large.

La chélation du chlorure d'aluminium $AlCl_3$ par les flavono ides, entraine l'émission d'une fluorescence jaune-vert.

Nous avons ajouté 1ml de réactif de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ à l'extrait hydroalcoolique. L'observation à la lumière UV à 360 nm d'une fluorescence jaune-vert indique une réaction positive[31].

Recherche des tanins par des réactions générales

➤ **Réaction de coloration avec le chlorure ferrique** :

La nature polyphénolique des tanins leurs permettent de former des complexes avec les métaux, tels que le fer, pour donner de diverses colorations selon le groupe de tanins :

- Tanins hydrolysables : coloration bleu noirâtre.
- Tanins condensés : coloration brune verdâtre.
- Tanins hydrolysables et condensés : coloration noirâtre.

Dans un tube, nous avons ajouté quelques gouttes du réactif chlorure ferrique   10%   5 ml du décocté aqueux de la drogue délipidée. Selon la couleur formée, le type de tanins sera distingué[31].

➤ **Réaction de précipitation avec la gélatine salée** :

Permet la caractérisation des tanins et plus précisément ceux ayant un PM élevé (formes oligo et polymères), en exploitant leur capacité à faire précipiter les protéines dans les solutions aqueuses.

Dans un tube, nous avons ajouté 1ml de gélatine salée à 5ml du décocté aqueux de la drogue délipidée. La formation d'un précipité blanc gélatineux est un indicateur de la réaction ayant abouti positivement[31].

Recherche des tannins condensés

➤ **Réaction de Stiasny** : Permet la caractérisation des catéchines et tanins catéchiques qui en milieu acide fort et à chaud, forment des cations réactifs, ces derniers en présence d'un nucléophile (formol) donnent des

composés hautement polymérisés appelés phlobaphènes qui apparaissent sous forme de précipité de couleur rouge brun[31].

Cette réaction a été réalisée sur deux séries de tubes :

-Nous avons procédé à la filtration du contenu du tube dans lequel a été réalisée la réaction entre le décocté aqueux et la gélatine salée. À 1ml du filtrat obtenu nous avons ajouté 3ml du réactif de Stiasny. L'ensemble a été chauffé à 60°C pendant 20-30 minutes.

- Nous avons ajouté 3ml du réactif de Stiasny à 1 ml du décocté aqueux de la drogue délipidée. L'ensemble a été chauffé à 60°C pendant 20-30 minutes.

La formation d'un précipité de couleur rouge brun est signe de la positivité de la réaction.

➤ **Réaction de Bath-Smith** : permet la caractérisation des tanins catéchiques. Le chauffage en milieu acide, Permet la dépolymérisation des tanins condensés, libérant ainsi des anthocyanidols correspondants de couleur rouge, qui sont extractibles dans l'alcool amylique ou butylique[31].

Cette réaction a été réalisée sur deux séries de tubes :

- Nous avons procédé à la filtration du contenu du tube dans lequel a été réalisée la réaction entre le décocté aqueux et la gélatine salée. À 1ml du filtrat obtenu nous avons ajouté 1ml du réactif de butanol-chlorhydrique. L'ensemble a été chauffé à 90°C pendant 5-10 minutes.

-Nous avons ajouté 1 ml du réactif de butanol-chlorhydrique à 1ml du décocté aqueux de la drogue délipidée. L'ensemble a été chauffé à 90°C pendant 5-10 minutes.

L'apparition d'un précipité rouge brun indique une réaction positive.

➤ **Recherche des anthocyanes** : Les anthocyanes réagissent en modifiant leur couleur selon le pH de leur environnement, un phénomène appelé changement de couleur dépendant du pH. Habituellement, elles prennent une teinte rouge dans un milieu acide (pH 1 à 3), violette dans des conditions neutres à légèrement basiques (pH 7 à 8), et bleue dans un environnement fortement basique (pH 10 à 14).

Dans des tubes à essai, nous avons préparé un décocté aqueux de la poudre des feuilles délipidées à différents PH (1, 2, 7, 13, 14). Nous avons noté la présence ou l'absence de couleur[31].

4.2. Analyse quantitative

➤ Dosage des polyphénols

La méthode de Folin-Ciocalteu a été adoptée pour doser les polyphénols totaux présents dans la plante *Marrubium vulgare*L.

Le réactif Folin-Ciocalteu est un acide jaune composé d'un mélange d'acide phosphomolybdiques et d'acide phosphotungstiques. Lors de l'oxydation des composés phénoliques, le réactif est réduit en mélange d'oxydes bleus de tungstène et molybdène, la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration des polyphénols présents dans la plante.

Dans un tube à essai, nous avons mélangé un volume de 200µl de chaque extrait (chloroformique et acétate d'éthyle) à une concentration de 0.5g/l pour chacun avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10) et 800µl de la solution aqueuse de carbonate de sodium (7,5 %). La solution obtenue a été incubée pendant 30min à l'obscurité et à température ambiante pour ensuite mesurer l'absorbance à $\lambda=760$ nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage (figure 01) établie avec les dilutions du standard (l'acide gallique) à différentes concentrations (0.01g/l, 0.02g/l, 0.03g/l, 0.04g/l, 0.05g/l, 0.06g/l, 0.07g/l, 0.08g/l, 0.09g/l, 0.1g/l) et pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon (extrait chloroformique et acétate d'éthyle) a servi pour la quantification des polyphénols. [19]

La solution de l'acide gallique a été préparée par solubilisation de 1g d'acide gallique dans 6ml du méthanol.

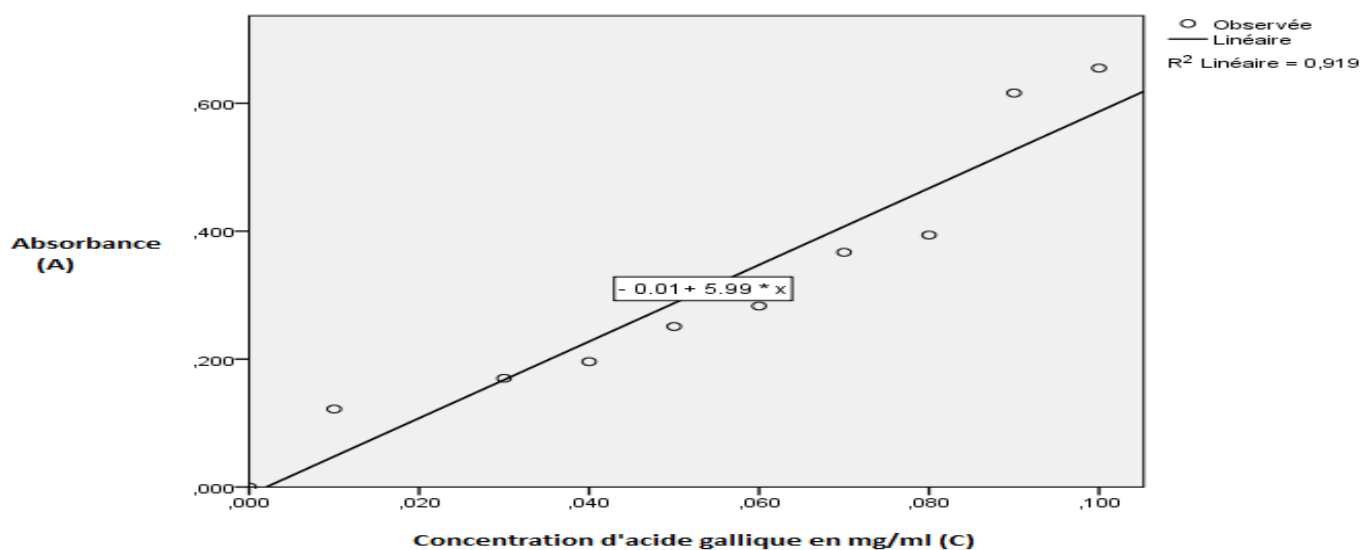


Figure 01 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique

➤ Dosage des flavonoïdes:

La quantification des flavonoïdes présents dans la plante est estimée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl₃). La formation d'une liaison covalente entre le trichlorure d'aluminium et les groupements hydroxyles (OH) des flavonoïdes produit un complexe de couleur jaune ayant une absorbance maximale à 430nm.

Dans un tube à essai, nous avons mélangé un volume de 500µl de chaque extrait (chloroformique et acétate d'éthyle) à une concentration de 0.5g/l pour chacun avec 1500µl d'eau distillée :

A t=0 : un volume de 150µl de la solution de nitrite de sodium (NaNO₂) à 2% (m/v) a été ajouté.

A t=5 minutes : nous avons ajouté 150µl de la solution de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10% (m/v).

L'ensemble a été incubé pendant 6 minutes à température ambiante et à l'obscurité. A la fin d'incubation, nous avons rajouté immédiatement 500µl de la soude (NaOH) à 1M. L'absorbance a été mesurée à 430nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage (figure 02) établie avec des dilutions du standard (la rutine) à différentes concentrations (0.01g/l, 0.02g/l, 0.03g/l, 0.04g/l, 0.05g/l, 0.06g/l, 0.07g/l, 0.08g/l, 0.09g/l, 0.1g/l, 0.11g/l, 0.12g/l, 0.13g/l, 0.14g/l, 0.15g/l, 0.2g/l) et pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon(extrait chloroformique et acétate d'éthyle) a servi à la quantification de la teneur des flavonoïdes.[19]

La solution mère de la rutine a été préparée par solubilisation de 8mg de rutine dans 8ml du méthanol.

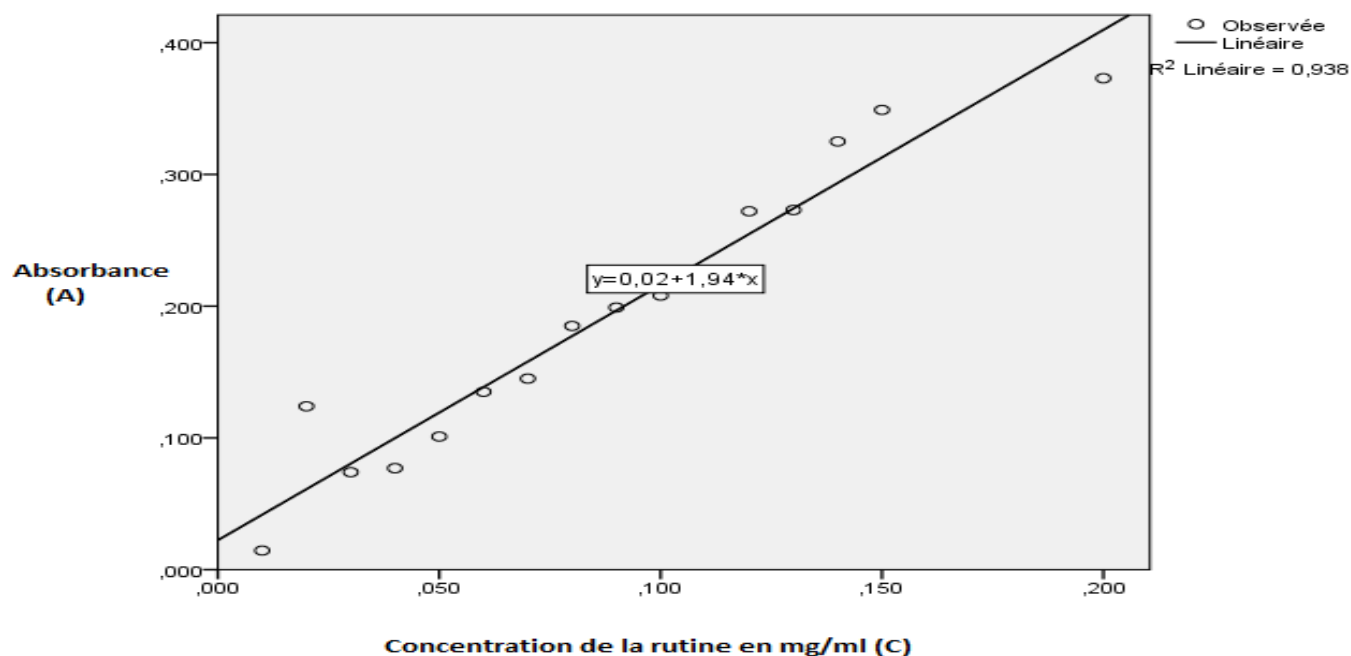


Figure 02 : courbe d'étalonnage de la rutine

➤ **Dosage des tanins:**

La méthode de la vanilline en milieu acide a été adoptée pour doser les tanins condensés, cela s'explique par la capacité des tanins à réagir avec la vanilline en se transformant en anthocyanidols de couleur rouge qui présentent un maximum d'absorption à 500nm.

Dans un tube à essai, nous avons mélangé 3ml d'une solution méthanolique de vanilline à 4% et 400µl de chaque extrait chloroformique et acétate d'éthyle à une concentration de 0.5g/l pour chacun, ce mélange a été bien agité à l'aide d'un vortex. Ensuite, nous avons ajouté 1,5ml d'HCl concentré avant de passer à l'incubation pendant 20min à l'obscurité et à température ambiante et nous avons mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 500 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage (figure 03) établie avec des dilutions du standard (la catéchine) à différentes concentrations (0.1g/l, 0.2g/l, 0.3g/l, 0.4g/l, 0.5g/l, 0.6g/l, 0.7g/l, 0.8g/l, 0.9g/l) et pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon (extrait chloroformique et acétate d'éthyle) a servi à la quantification de la teneur des tanins.[32].

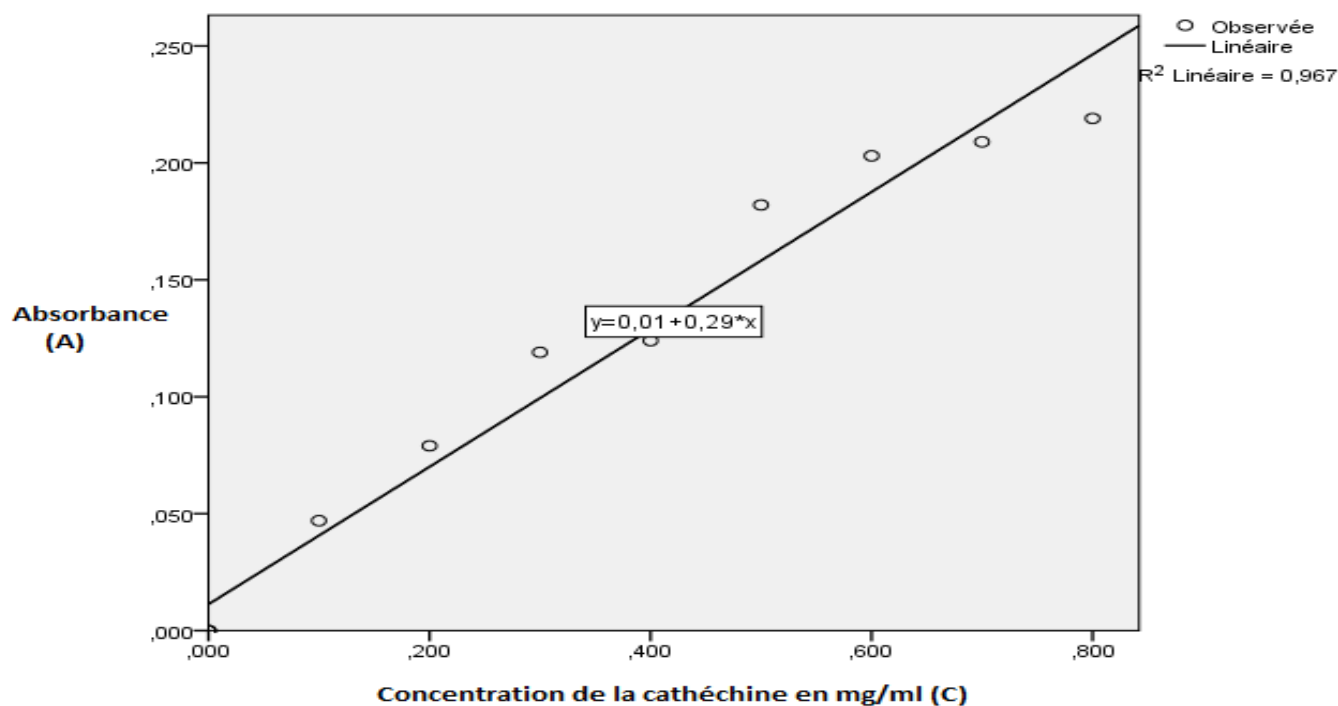


Figure 03 : courbe d'étalonnage de la catéchine

5. Étude de l'activité antioxydante in vitro

➤ Méthode de DPPH (2,2-DiPhényl 1-PicrylHydrazyle) :

L'activité antiradicalaire a été évaluée par la méthode au DPPH. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres d'une solution de DPPH. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette) en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical. La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à une longueur d'onde déterminée.

La solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 6 mg de DPPH dans 160 ml du méthanol. 100µl de chaque extrait (chloroformique, acétate d'éthyle) à différentes concentrations (0.1 µg/ml, 0.15 µg/ml, 0.2 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.3 µg/ml, 0.35 µg/ml, 0.4 µg/ml, 0.45 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.55 µg/ml, 0.6 µg/ml, 0.65 µg/ml, 0.7 µg/ml, 0.75 µg/ml) que nous avons additionné à 2,9 ml de la solution de DPPH préparée. Nous avons également préparé le témoin négatif composé de 2,9 ml de la solution DPPH et 100µl du méthanol. L'ensemble a été incubé à l'abri de la lumière à 37°C pendant 2 heures. Ensuite, la lecture de l'absorbance a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre UV à une longueur d'onde de 570nm contre un blanc composé du méthanol uniquement.

Les résultats sont exprimés en µg/ml, et en concentration inhibitrice 50 (CI50) qui correspond à la concentration nécessaire pour piéger 50% des radicaux libres DPPH comparée à celle du standard qui est l'acide ascorbique [32].

La formule suivante permet le calcul du pourcentage d'inhibition :

$$\%I = (DO_c - DO_e) / DO_c * 100$$

DO_c : densité optique du témoin négatif.

DO_e : densité optique de l'extrait

➤ Méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power):

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe ferrocyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) en Fe²⁺, la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) en

couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

Nous avons mélangé un volume de 1 ml de différentes concentrations de chaque extrait (chloroformique et acétate d'éthyle) (5 $\mu g/ml$, 10 $\mu g/ml$, 15, $\mu g/ml$ 20 $\mu g/ml$, 25 $\mu g/ml$, 30 $\mu g/ml$, 35 $\mu g/ml$, 40 $\mu g/ml$, 45 $\mu g/ml$, 50 $\mu g/ml$, 55 $\mu g/ml$, 60 $\mu g/ml$, 65 $\mu g/ml$, 70 $\mu g/ml$, 75 $\mu g/ml$, 80 $\mu g/ml$, 85 $\mu g/ml$, 90 $\mu g/ml$, 95 $\mu g/ml$, 100 $\mu g/ml$) avec 2,5 ml de la solution de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1 % et 2,5 ml de la solution tampon phosphate (PH=6,6). L'ensemble a été chauffé à 50 °C au bain marie pendant 20 minutes. Après refroidissement à température ambiante, nous avons ajouté 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10 % pour arrêter la réaction. Les tubes ont été agités au vortex pendant 1 minute. Ensuite, nous avons mélangé 2,5 ml du surnageant avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3$) à 0,1 % fraîchement préparée. L'absorbance a été mesurée contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard dans cette expérience dans les mêmes conditions.

Les résultats sont exprimés par la CI50 qui correspond à la concentration nécessaire pour réduire 50% d'ion ferrique[32].

III. RESULTATS

1. Étude botanique

Examinées à l'œil nu, les feuilles fraîches du *Marrubium vulgare L.* été simples, pétiolées de forme ovales ou arrondies, duveteuses, gaufrées à l'aspect froissé à limbe épais et crénelé sur les bords, possédant une face supérieure de couleur vert foncé et une face inférieure vert blanchâtre. Les feuilles sèches étaient molles légèrement enroulées avec une saveur amère.

L'examen microscopique de la coupe transversale de la feuille du *Marrubium vulgare L.* a permis d'observer : un limbe comportant de la face supérieure à la face inférieure un épiderme supérieur cutinisé, moins stomatifère portant des poils tecteurs pluricellulaires unisériés et en bouquet formés de cellules à parois lisses ;des poils sécréteurs : à tête octacellulaire et pied pluricellulaire, tête unicellulaire, bicellulaire et pied unicellulaire. Une assise du parenchyme palissadique, un parenchyme lacuneux avec des macles et prismes d'oxalate de calcium, un épiderme inférieur moins cutinisé plus stomatifère avec de nombreux poils ayant les mêmes caractéristiques que celles décrites dans l'épiderme supérieur. La nervure centrale est très saillante à la surface inférieure et aplatie à la surface supérieure et comportant de la surface supérieure à la surface inférieure : un collenchyme rond, un parenchyme à méats, un faisceau libéro-ligneux avec début de formations secondaires.

L'examen microscopique de la poudre du *Marrubium Vulgare*L. a permis de confirmer les éléments observés dans la coupe transversale dont : des fragments de l'épiderme avec des stomates diacytiques, des fragments du limbe avec un parenchyme palissadique et des vaisseaux spiralés du bois ; des poils tecteurs : unicellulaires à tête pointue, pluricellulaires unisérié ou en bouquet. Des poils sécréteurs à pied unicellulaire et tête soit : unicellulaires, bicellulaire ou octacellulaire, des fibres sclérenchymateuses et des macles d'oxalate de calcium.

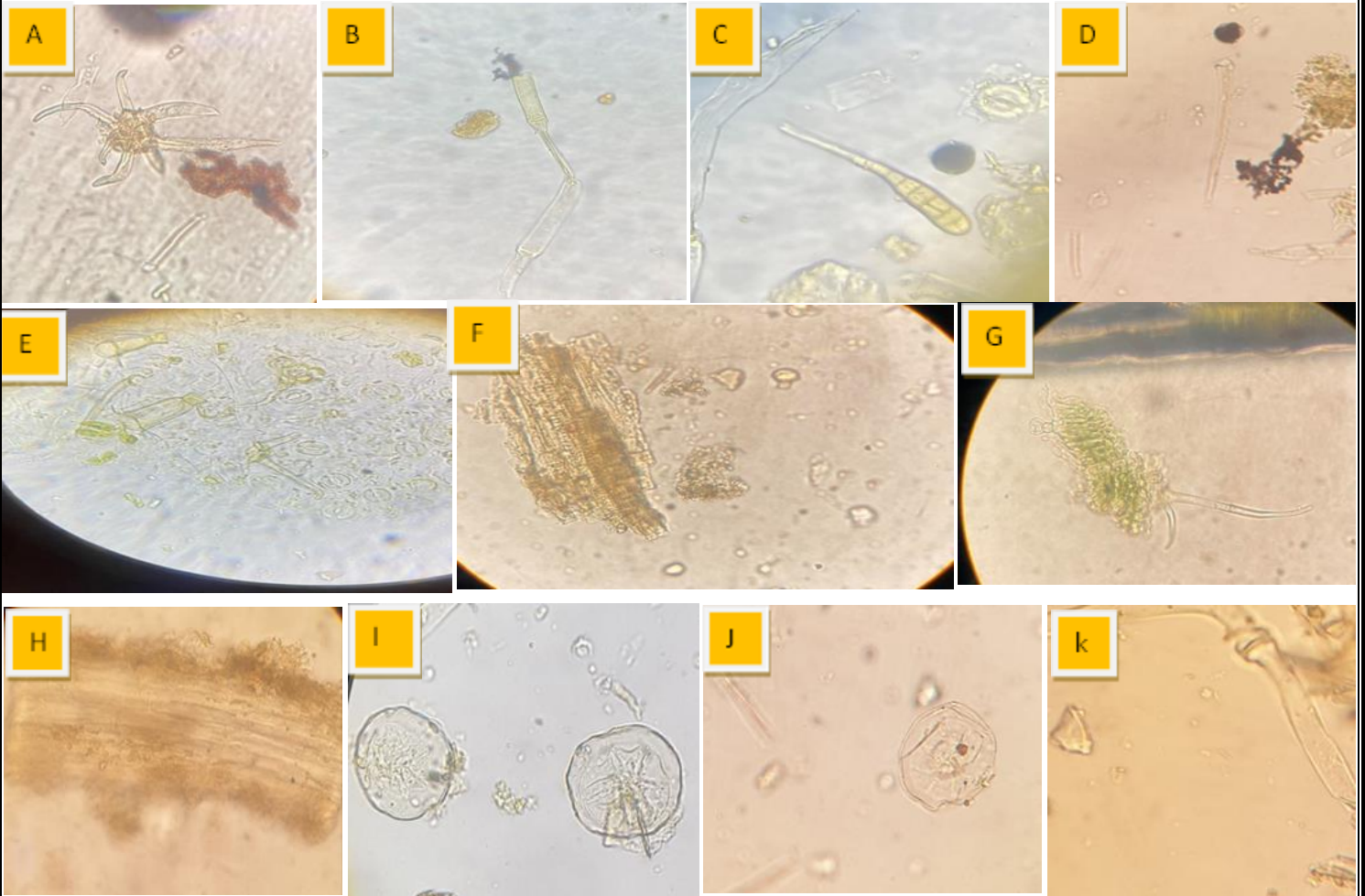


Figure 01 : éléments caractéristiques du *Marrubium vulgare*L. observés au microscopique optique aux différents grossissements (G×10 et G×40) : **A** poil tecteur pluricellulaire en bouquet, **B** poil tecteur pluricellulaire unisérié, **C** poil sécréteur pluricellulaire, **D** poil tecteur unicellulaire à extrémité pointue, **E** fragment de l'épiderme avec stomates diacytiques, **F** fragment de parenchyme avec des vaisseaux spiralés du bois, **G** fragment du limbe avec parenchyme palissadique et poil sécréteur à pied unicellulaire et tête bicellulaire et poil tecteur unicellulaire , **H** fibre sclérenchymateuse, **I** poil sécréteur à tête octacellulaire, **J** macles d'oxalate de calcium , **K** prisme d'oxalate de calcium.

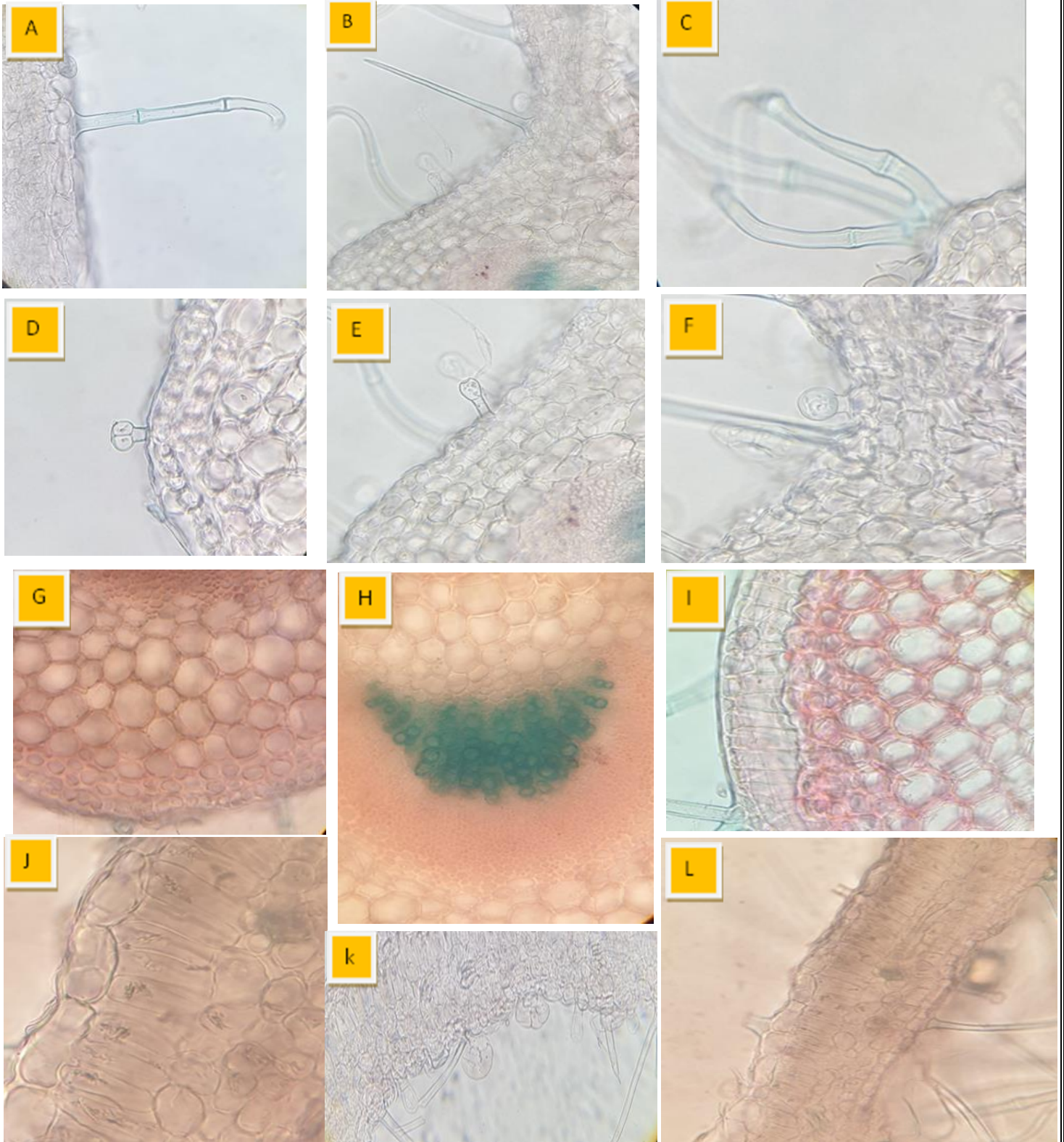


Figure02: éléments caractéristiques de la feuille de *Marrubium vulgare* L. observés au microscope optique au grossissement $G \times 40$: **A** poil tecteur pluricellulaire unisérié, **B** poil tecteur unicellulaire à extrémité pointue, **C** poil tecteur pluricellulaire en bouquet, **D** poil sécréteur à tête bicellulaire et pied unicellulaire, **E** poil sécréteur à tête unicellulaire et pied pluricellulaire, **F** poil sécréteur à tête unicellulaire et pied unicellulaire, **G** collenchyme rond, **H** faisceaux libéro-ligneux avec début de formations secondaires, **I** parenchyme à méats, **J** macles d'oxalate de calcium au niveau du parenchyme lacuneux, **K** poils sécréteurs à tête octacellulaire et pied unicellulaire, **L** limbe avec une seule assise de parenchyme palissadique au niveau de l'épiderme supérieur seulement.



Figure03 : coupe transversale de la feuille de *Marrubium vulgare*L. observée sous microscope optique au grossissement G×10

2. Screening phytochimique

Le tableau I montre les résultats obtenus des réactions chimiques et colorimétriques effectuées qui révèle la présence de métabolites primaires tels que : les sucres réducteurs, lipides, protéines et secondaires comme : saponosides, stéroïdes, alcaloïdes, flavonoïdes, tannins, hétérosides cardiotoniques.

Tableau I : résultats du screening phytochimique des feuilles de *Marrubium vulgare*L.

Réactions	Résultats
Recherche des glucides	
Sucres réducteurs à la réaction de Fehling	+ (Précipité rouge brique)
Polysaccharides à l'éthanol	-
Recherche des lipides	
Réaction au soudan III	+ (tâche rouge)
Recherche des protéines	
Réaction de Biuret	+ (Coloration violet)
Réaction de Ninhydrine	-
Recherche des terpénoïdes	
Réaction de Liebermann	+ (Coloration rouge brunâtre qui vire vers le vert olive)
Recherche des alcaloïdes	
Réactif de Mayer	-
Réactif de Drangendorf	+ (Précipité blanc)
Réactif de Bouchardât	+ (Précipité noir) + (Précipité noir)
Recherche des saponosides :	
Recherche de quinones libres :	+ (Formation de mousse) -
Recherche des composés phénoliques	
Recherche des flavonoïdes	
Test FeCl ₃ à 2%	-
Réaction à la Cyanidine	+ (Coloration jaune)
Test ALCL ₃	+ (Coloration orange) + (Fluorescence jaune verdâtre)

Tableau I : résultats du screening phytochimique des feuilles de *Marrubium vulgare*L (Suite)

Réactions	Résultats
Recherche des tanins :	
Test FeCl ₃	+ (coloration vert brunâtre)
Gélatine salée :	-
Réaction de Stiasny :	+ (coloration rouge brunâtre)
Réaction de Bath-Smith :	+ (précipité brun rougeâtre)
Recherche des anthocyanes :	
	-
Recherche des hétérosides cardiotoniques :	
Réaction de Libermann	+ (Coloration rouge brunâtre virant en vert olive)
Réaction de Baljet	+ (Coloration jaune orangé)
Réaction de Kedde	+ (Coloration rouge violacé)
Réaction de Raymond Marthoud	+ (Coloration bleu violacé)
Réaction de Killer Killiani	+ (Formation d'un anneau rouge sur La surface des deux acides)

+ : présence, - : absence

3. Résultats de l'analyse quantitative

Le dosage spectrophotométrique des composés phénoliques des deux extraits des parties aériennes de *Marrubium vulgare*L., a montré que l'extrait chloroformique est plus riche en flavonoïdes et tanins par contre l'extrait acétate d'éthyle est plus riche en polyphénols, comme il est représenté dans la **figure 4** :

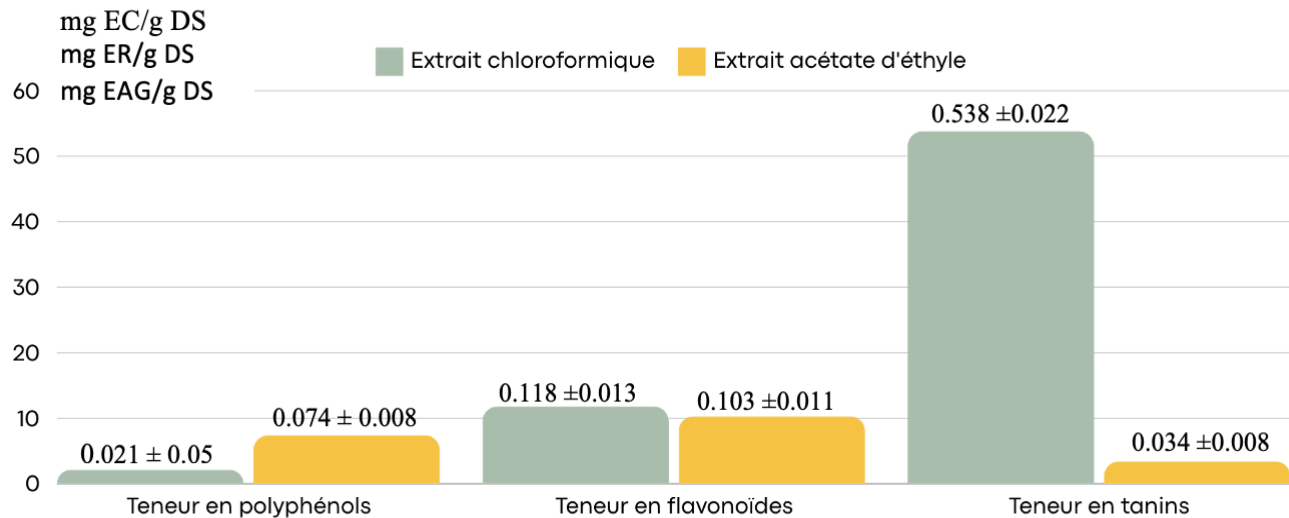


Figure 04 : histogramme de la teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins des deux extraits chloroformique et acétate d'éthyle des parties aériennes de *Marrubium vulgare*L.

3. Activité antioxydante in vitro

Les deux extraits de *Marrubium vulgare*L. ont révélé une activité antioxydante inférieure à celle de l'acide ascorbique utilisé comme standard. L'extrait acétate d'éthyle a démontré une activité de piégeage des radicaux libres de DPPH supérieure à celle de l'extrait chloroformique avec une concentration inhibitrice 50 de l'ordre de 82.54 µg/ml versus 1388.32 µg/ml respectivement. Idem pour la réduction de l'ion ferrique, l'extrait acétate d'éthyle a présenté une activité réductrice supérieure à celle de l'extrait chloroformique avec une valeur de CI50 de l'ordre de 4144.97µg/ml contre 38370.38µg/ml respectivement. Les résultats sont représentés dans les **figures 05 et 06** :

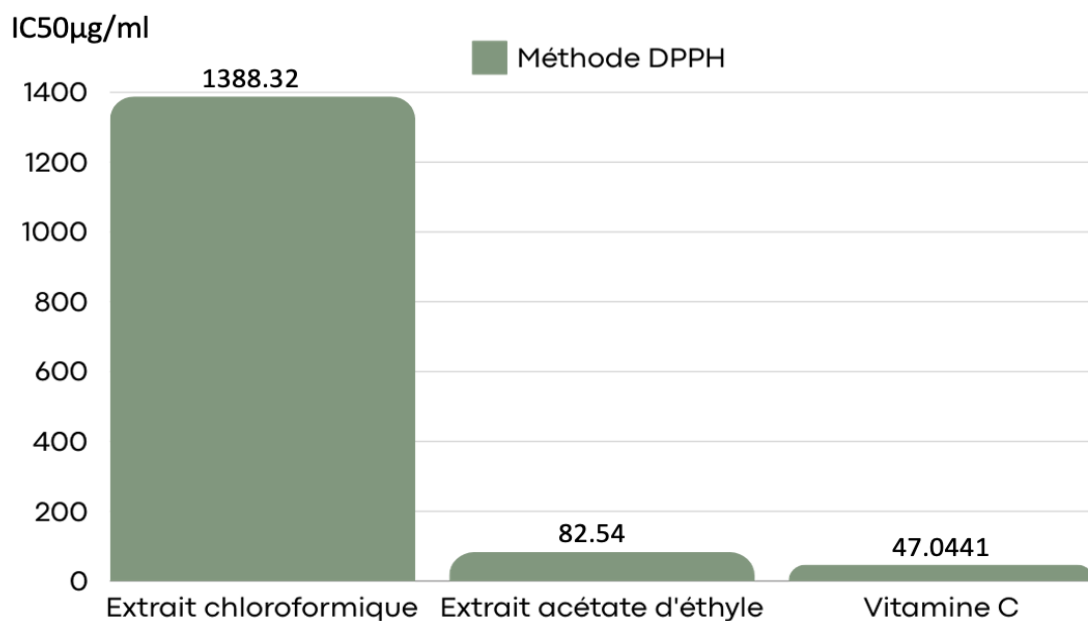


Figure 05 : histogramme des IC50 des différents types d'extraits et le standard par méthode DPPH

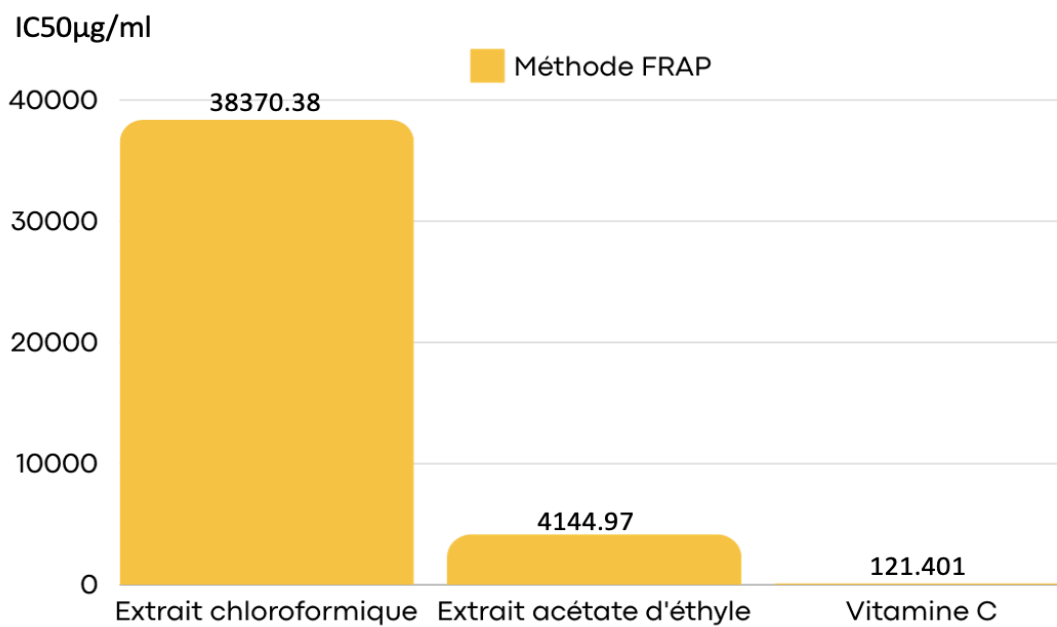


Figure 06 : histogramme des IC50 des différents types d'extraits et le standard par méthode FRAP

IV. Discussion:

Cette étude est portée sur la valorisation d'une plante médicinale algérienne, le *Marrubium vulgare*L. à travers la réalisation de l'étude botanique, phytochimique et enfin l'évaluation de son activité antioxydante in vitro.

L'étude botanique de la plante a été réalisée grâce à deux types d'observations : l'observation macroscopique à l'œil nu et microscopique au microscope optique. L'observation macroscopique des feuilles de *Marrubium vulgare* L., a montré qu'elles sont simples, pétiolées de forme ovales ou arrondies, duveteuses, gaufrées à aspect froissé à limbe épais et crénelé sur les bords, possédant une face supérieure de couleur vert foncé et une face inférieure vert blanchâtre. Les feuilles sèches étaient molles légèrement enroulées avec une saveur amère. Ceci est cohérent avec les données de la littérature [8,20–22].

Concernant les observations microscopiques de la coupe transversale et de la poudre, elles montrent la présence des éléments caractéristiques anatomiques et histologiques des Lamiacées comme les poils tecteurs coniques, les poils sécréteurs de type globulaires qui n'adhèrent à l'épiderme que par un point de leur périphérie, qu'on peut trouver sur le calice (*Mentha peperita*.L), les anthères (*Marrubium hispanicum*.L), ceci permet de différencier entre les différents genres et espèces de cette famille et par conséquent de vérifier l'identification et l'absence d'une falsification de l'espèce étudiée.[8,35–37].

Quant à l'analyse phytochimique qualitative, elle a révélé la présence de métabolites primaires (sucres réducteurs, des lipides et des protéines) et secondaires (des saponosides, des flavonoïdes, des tanins condensés, des hétérosides cardiotoniques et alcaloïdes) conformément aux études menées sur la même espèce collectée dans de différentes régions en Algérie[38–40]. En revanche, des résultats contradictoires ont été rapportés dans la littérature concernant la présence des alcaloïdes[41,42] et des hétérosides cardiotoniques[43] dans le Marrube blanc. Ceci peut s'expliquer par leur présence à l'état de traces ou par leur instabilité, d'où l'intérêt de les caractériser à l'aide de protocoles spécifiques au *Marrubium vulgare* L.

L'analyse phytochimique quantitative des composés phénoliques a montré que l'extrait acétate d'éthyle était plus riche en polyphénols que l'extrait chloroformique (0.074 mg EAG/ g DS versus 0.021 mg EAG/ g DS respectivement), ceci peut être expliqué par la présence de composés phénoliques plus polaires, et donc plus solubles dans l'acétate d'éthyle que dans le chloroforme[44]. Cependant, d'autres études ont obtenu des concentrations beaucoup plus élevées (entre 0.25 et 1.95 mg EAG/ g MS) même avec des solvants moins polaires notamment l'éther[17], ceci peut être expliqué par la différence dans les méthodes d'extraction utilisées, conditions climatiques propres au biotope d'espèce telles que la salinité, la sécheresse et l'exposition

au soleil, qui influent sur la biosynthèse des métabolites secondaires, ainsi que la quantité de la drogue utilisée par le chercheur (100g) qui est supérieure à celle que nous avons utilisée (20g)[45].

En ce qui concerne la teneur en flavonoïdes, notre extrait chloroformique était plus riche que l'extrait acétate d'éthyle (0,118 mg ER/g DS versus 0,103 mg ER/g DS respectivement), alors qu'une autre étude effectuée dans trois régions différentes (Tessala, M'Sila, Ain Skhouna) a trouvé que l'extrait acétate d'éthyle est plus riche en flavonoïdes que l'extrait chloroformique avec un taux de 7.5% et 4.5% respectivement[46], ainsi une autre étude réalisée à RedjaounaTizi-Ouzou a démontré un taux plus élevé dans l'extrait acétate d'éthyle (9.4%)[47]. Cela s'explique par le fait que la concentration des flavonoïdes varie selon le solvant utilisé, dans ce contexte, Bruneton et Stanković ont noté que les hétérosides de flavonoïdes se dissolvent dans des solvants polaires, tandis que les génines (la partie aglycone des flavonoïdes) sont solubles dans des solvants apolaires[17]. Dans notre extrait, il est apparu que la plupart des flavonoïdes de *Marrubium vulgare L.* sont des flavonoïdes non glycosylés car ils ont la capacité d'être plus facilement dissous dans les solvants apolaires que les solvants polaires.

Le dosage des tanins par la méthode à la vanilline a montré que notre extrait chloroformique est presque 15fois plus riche en tanins condensés que l'extrait acétate d'éthyle (0,538 mg EC/g DS versus 0.034 mg EC/g DS respectivement). Ces résultats ne concordent pas avec ceux d'une étude menée sur le *Marrubium vulgareL.* qui a obtenu une teneur plus élevée avec l'acétate d'éthyle avec une concentration de 0.060 mg EAT/g MS, ceci nous mène à dire que la concentration en tanins dépend du solvant d'extraction d'une part mais aussi d'autres facteurs à savoir la méthode d'extraction, la sensibilité des tanins à la lumière et l'oxydation (conditions de dosage), le stade de maturité de la plante, les conditions climatiques, culturelles[17].

Concernant l'activité antioxydante des parties aériennes de *Marrubium vulgare L.*, elle a été évaluée selon deux méthodes complémentaires : la capacité de piégeage d'un radical libre DPPH et la capacité de réduction de l'ion ferrique FRAP. Les résultats obtenus ont été exprimés en IC50 qui est la concentration de l'extrait capable de piéger 50% des radicaux libres ou de réduire 50% de l'ion ferrique. Ainsi, une valeur plus faible de IC50 indique une activité antioxydante plus élevée.

Nos extraits ont montré une activité antioxydante nettement très inférieure à celle du standard utilisé qui est la vitamine C. L'extrait d'acétate d'éthyle a révélé une capacité de piégeage des radicaux DPPH supérieure à celle de l'extrait chloroformique avec IC50=82.54 µg /ml versus IC50=1388,32 µg /ml ,ces résultats sont similaires à ceux trouvés par la méthode FRAP qui a montré que l'extrait acétate d'éthyle a été plus actif que le chloroformique avec IC50=4144.97 µg /ml contre IC50= 38370.38 µg /ml .Nos résultats rejoignent en partie les résultats de la littérature qui ont trouvé que l'extrait acétate d'éthyle présente une IC50 des radicaux DPPH

=91,49 ±0,50 µg /ml versus IC50= 225,23 ± 5,10 µg /ml pour l'extrait chloroformique et une capacité de réduction de l'ion ferrique plus élevée que celle de l'extrait chloroformique[48,49], contrairement à l'étude de K. Bouterfas dans laquelle l'extrait chloroformique était plus actif sur les radicaux DPPH que l'extrait d'acétate d'éthyle (IC50=35,4 g/ml versus une IC50=56,6 g/ml). Ceci peut être dû au fait que l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la dose en composés phénoliques mais aussi de leur structure notamment du nombre et la position des groupements hydroxyles[46]. Globalement, les mécanismes de l'activité antioxydante des composés phénoliques sont soit le transfert d'atomes d'hydrogène, le transfert d'électrons et enfin la chélation des métaux de transition.

Enfin, cette étude a permis d'évaluer la composition phénolique de cette plante et d'établir une comparaison de l'activité antioxydante entre 2 types d'extraits chloroformique et acétate d'éthyle et par ailleurs, la valorisation de cette espèce de la région de Maâtkas. Cependant, plusieurs limites ont été rencontrées lors de la réalisation de notre travail de recherche. Tout d'abord, la disponibilité du Marrube blanc a constitué un problème majeur. Nous avons dû la récolter au mois d'octobre, une période où elle était presque introuvable, particulièrement en raison de la sécheresse de l'été précédent et l'existence de différentes espèces qui compliquent son identification et la récolte d'une quantité suffisante pour l'étude. Bien qu'elle soit normalement récoltée au printemps, En outre, le matériel du laboratoire de pharmacognosie de la faculté de médecine de Tizi-Ouzou s'est révélé peu performant, ce qui nous a contraints à répéter plusieurs fois les différentes méthodes expérimentales et à solliciter l'aide des autres laboratoires afin d'obtenir des résultats fiables. Enfin, nous avons été limitées par un manque de données bibliographiques, ce qui a restreint notre accès à des sources d'informations et des études comparatives essentielles pour approfondir notre analyse.

IV. Conclusion

Cette étude a permis l'évaluation de la composition phénolique et le pouvoir antioxydant de l'espèce *Marrubium vulgare L.* de la région de Maâtkas, réalisé sur deux types d'extraits : chloroformique et acétate d'éthyle, par deux méthodes différentes, ont permis de mettre en évidence que l'extrait d'acétate d'éthyle possède une forte activité concernant la capture des radicaux libres DPPH et la réduction de l'ion ferrique contre l'extrait chloroformique. En outre, l'analyse quantitative a permis de démontrer que cette plante est riche en composés phénoliques avec l'extrait d'acétate d'éthyle plus riche en polyphénols contre l'extrait chloroformique plus riche en flavonoïdes et tannins. En effet, ces résultats valorisent cette espèce qui pourrait être un bon candidat pour des recherches plus approfondies dans le développement d'un nouvel antioxydant.

Le marrube blanc est connu pour ses vertus thérapeutiques procurées, sa culture avant était très répandue dans la région, cependant avec l'avancement de la médecine moderne et la synthèse de médicaments chimiques, ainsi que le changement climatique, cette espèce devient de plus en plus menacée. Pour cela, il faut prendre des mesures urgentes afin de la protéger telles que :

-La promotion de sa culture et cela en sensibilisant les gens concernant ses vertus thérapeutiques en tirant profit de l'expérience de la médecine traditionnelle.

-La protection de ses habitats naturels et l'éviction de son exploitation anarchique.

-Créer une sélection de variétés à haut rendement en principes actifs et encourager sa production locale, afin de l'exploiter en industrie pour la fabrication des médicaments et de produits alimentaires. Cela permet d'assurer la pérennité de l'espèce ainsi que de tirer des avantages économiques.

Ainsi en termes de perspectives et dans le but de compléter ce travail, il serait intéressant de réaliser une cartographie concernant les différentes espèces *Marrubium* en Kabylie, ainsi que d'évaluer d'autres activités biologiques que ce soit in vivo ou in vitro et enfin, l'étude de la toxicité aiguë, subaiguë et chronique.

Références :

1. Zerbe P, Chiang A, Dullat H, O'Neil-Johnson M, Starks C, Hamberger B, et al. Diterpene synthases of the biosynthetic system of medicinally active diterpenoids in *Marrubium vulgare*. 2014;79(6):914-27.
2. Faye L, Champey Y. Plantes, médicaments et génétique - Quelles applications pour demain? médecine/sciences [Internet]. 1 nov 2008. Disponibles sur: <https://www.medicinesciences.org/articles/medsci/abs/2008/12/medsci20082411p939/medsci20082411p939.html>
3. Bouzabata A. Les médicaments à base de plantes en Algérie: réglementation et enregistrement. *Phytothérapie*. 23 déc 2016. disponibles sur: https://www.researchgate.net/publication/311896630_Les_medicaments_a_base_de_plantes_en_Algerie_reglementation_et_enregistrement
4. Aćimović M, Jeremić K, Salaj N, Gavarić N, Kiprovski B, Sikora V, et al. *Marrubium vulgare* L.: A Phytochemical and Pharmacological Overview. *Molecules*. 24 juin 2020.;25(12):2898.
5. Bouterfas K, Mehdadi Z, Latrèche A, Cherifi K. Autoécologie du Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) et caractérisation de la biodiversité végétale dans le Djebel de Tessala (Algérie nord-occidentale). *Ecol Mediterr*. 2013;39(2):39-57.
6. Louli C, Mahrouchi A, Nour D, Kamour B. Contribution à une étude ethnobotanique sur les plantes cicatrisantes dans la wilaya de Tizi-Ouzou 2022.
7. Boutabia L, Telailia S, Mena. Utilisations thérapeutiques traditionnelles du *Marrubium vulgare* L. par les populations locales de la région de Haddada (Souk Ahras, Algérie) Traditional therapeutic uses of *Marrubium vulgare* L. by local populations in the Haddada region (Souk Ahras, Algeria) Correspondence [cité 6 déc 2023]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/341283871_Utilisations_therapeutiques_traditionnelles_du_Marrubium_vulgare_L_par_les_populations_locales_de_la_region_de_Haddada_Souk_Ahras_Algerie_Traditional_therapeutic_uses_of_Marrubium_vulgare_L_by_local_p
8. Ahvazi M, Balali GR, Jamzad Z, Saeidi H. A Taxonomical, Morphological and Pharmacological Review of *Marrubium vulgare* L., An Old Medicinal Plant in Iran. *J Med Plants*. 1 mars 2018 ;17:7-24.
9. Zaabat N, Hay AE, Michalet S, Darbour N, Bayet C, Skandrani I, et al. Propriétés antioxydantes et antigénotoxiques des composés isolés de *Marrubium deserti* de Noé. *Food Chem Toxicol*. 1 déc 2011.8:353-358
10. Herrera-Arellano A, Aguilar-Santamaría L, García-Hernández B, Nicasio-Torres P, Tortoriello J. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine*. 25 nov 2004 ;11(7):561-6.
11. Boudjelal A, Henchiri C, Siracusa L, Sari M, Ruberto G. Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia*. 1 mar 2012 ;83(2):286-92.
12. Al-Zaban M, Naghmouchi S, AlHarbi NK. HPLC-Analysis, Biological Activities and Characterization of Action Mode of Saudi *Marrubium vulgare* against Foodborne Diseases Bacteria. *Molecules*. 24 août 2021 ;26(17):5112.
13. Boumerdassi S, Chabour R, Chouh S, Groni A. Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales traditionnellement utilisées chez l'enfant. Tizi Ouzou ;2021.
14. Sebastiaan Dallinga J, Voss HP, Haenen GRMM, Bast A. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chem*. 1 mar 2003 ;80(3):409-14.
15. Boulila A, Sanaa A, Salem IB, Rokbeni N, M'rabet Y, Hosni K, et al. Propriétés antioxydantes et variation phénolique dans les populations sauvages de *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *Ind Crops Prod*. 15 déc 2015 ;76:616-22.
16. Boudjelal A. extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs (*Ajugaiva*

- L. , *Artemisia herba alba* L. et *Marrubium vulgare* L)de la région de M'Sila, Algérie; 2012;
17. Ghedadba N, Hambaba L, Aberkane M, Oueld Mokhtar SM.Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L. Août 2014.2(2):64-74
 18. Ghedadba N, Bousselsela H, Hambaba L, Ben Yahia S, Mouloud Y. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of the leaves and flowered tops of *Marrubium vulgare* L. *Phytotherapie*. 1 janv 2014 ;12:15-24.
 19. Maache H, Mebarka H, Mebarki A. Optimisation de l'extraction des composés phénoliquesdes feuilles de *Pergularia tomentosa* L ., Asclépiadacée et étude de leur activité antioxydante in vitro etleur toxicité aigüe par voie orale sur des souris BALB \c. Tizi Ouzou ;2023
 20. Boudehane E, Bouchefifa F, Desdous N, Boutennoun H Screening phytochimique et activité antioxydante de quelques plantes médicinales. Université de Jijel; 2019 .
 21. Boucher B, Mettre en évidence - sucres réducteurs [Internet].[cité 21 juin 2024]. Disponiblesur : <https://svt.ac-versailles.fr/IMG/archives/bosvt/reducteurs.html>
 22. Boual Z, Kemassi A, Oudjana AH, Michaud P. caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles *MALVA PARVIFLORA* L. (MALVACEAE) : activité prebiotique . *Leban Sci J*. 2013;14(2).
 23. ENSFEA, 2-test-du-biuret.pdf. [cité 21 juin 2024]. Disponible sur: <https://sites.ensfea.fr/physique-chimie/wp-content/uploads/sites/10/2016/10/2-test-du-biuret.pdf>
 24. ENSFEA,1- Test à la Ninhydrine. [cité 21 juin 2024].Disponible sur : <https://sites.ensfea.fr/physique-chimie/wp-content/uploads/sites/10/2016/10/1-test-a-la-ninhydrine.pdf>
 25. BoucherB.2-test-du-biuret.pdf Mettre en évidence. [cité 21 juin 2024]. Disponible sur: <https://svt.ac-versailles.fr/IMG/archives/bosvt/lipides.html>
 26. Saharoui D. Les hétérosides cardiotoniques .
 27. Daira NEH, Maazi MC, Chefrour A. Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale *Ammoides verticillata* (Desf.) Briq. de l'Est Algérien. *Bull Société R Sci Liège*. 2016 , Vol . 85,2016, p . 276 - 290
 28. Ouriagli T, Amnay A, Raoui S, Errachidi F, Fouad O, Chabir R. Tropical Journal of Natural Product Research Alkaloids from *Marrubium vulgare* L.: Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities as a Function of Extraction Methods. *Trop J Nat Prod Res*. 1 juill 2023;7(7)3411-3420.
 29. Maman Manzo L. Habibou Hamou H, Souley Karou M.Criblage phytochimique et dosage des polyphénols du *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. Utilisé dans le traitement des maladies parasitaires au Niger.Nov 2018.14(5) (2018) 390 - 399
 30. Ben Moussa MT.10_saponoside.
 31. Bruneton J. Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales 5eme édition; Lavoisier ; 05_2016.
 32. Ghedadba. Contribution à l'étude de l'activité biologique des deux espèces de *Marrubium vulgare* L et *Marrubium deserti* de Noé in vitro et in vivo. Batna.2018.
 33. Benabderrahmane W, Djillaili I. Contribution à l'étude phytochimique de la plante *Marrubium vulgare* L. Naâma ;2020.
 34. Chadi FZ, Letkesses H. Activités biologiques de 3 plantes médicinales: *Marrubium vulgare*L.,*Nigella sativa*L. et *Trigonillafoenumgraecum*L.Constantine; 2022.

35. Mirbel CFB de. Mémoire sur l'anatomie et la physiologie des plantes de la famille des Labiées. 1810. 68 p. Muséum d'Histoire Naturelle; 1810.
36. Arnold N, El Beyrouthy M, De Foucault B, Dupont F. Observations morpho—anatomiques et histo-chimiques sur les *Teucrium* de Chypre : *T. kotschyanum* Poech, *T. divaricatum* Heldr. subsp. *canescens* (Čelak.) Holmboe, *T. cyprium* Boiss. subsp. *cyprium* et *T. micropo- dioides* Rouy. Acta Bot Gallica. janv 2010;157(3):525-38.
37. Meguellati H, Ouafi S, Saad S, Harchaoui L, Djemouai N. Etude morphologique et histo-anatomique de la plante médicinale *Teucrium polium* L. subsp. *geyrii* Maire (Tamanrasset, Algérie). Int J Nat Resour Environ. 24 mai 2023 ;4(2):1-11.
38. Khouchlaa A, Rahimi A, Mimouni M, Rais C, Khamar H, Zaakour F. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activities of *Marrubium vulgare* L. collected in three development stages. Not Sci Biol . 7 sept 2023 ;15(3):11615-11615.
39. Moulay M, Labdelli F, Bousmaha F, Djerbaoui MA, Bouteldja R, Doucene R. Physicochemical and phytochemical study of *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae family). J Fundam Appl Sci. 2020;12(2):728-37.
40. Azzi R, Lahfa F, Djaziri R. étude phytochimique, antihyperglycémique et antihyperlipidémique de l'extrait hydroalcoolique brut de parties aériennes de *Marrubium vulgare* L. Chez des rats wistar normaux et induits à la streptozotocine | revue internationale des sciences et de recherche pharmaceutiques. 2014
41. Hayat J, Akodad M, Moumen A, Baghour M, Skalli A, Ezrari S, et al. Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare* L. from 2 different localities of Northeast of Morocco. Heliyon. nov 2020 . Héliyon 6 (2020) e0560
42. Boutelis D A. Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. Jan 2014.
43. Bouzourene S, Boukache S. Etude phytochimique du marrube blanc. Tizi Ouzou 12 juil 2012
44. Ghedadba N. Polyphénols totaux, activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé, Avr 2015 ,13(2):118-129
45. Hameg T, Taleb D. Évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante des composés phénoliques du *Marrubium vulgare* L. Tizi ouzou. 2019
46. Bouterfas K, Mehdadi Z, Latreche A, Elaoufi M, Benchiha W. Bouterfas et al . Antioxidant activity and total polyphenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare* L.) from three geographical origins 22 oct 2022 Annales Pharmaceutiques Françaises 74(6)
47. Houazene M, Alen O. Etude de l'activité antibactérienne des flavonoïdes et des tannins du marrube blanc et l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait tannique . tizi-Ouzou ;28 / 09 / 2017
48. Pukalskas A, Venskutonis PR, Salido S, Waard P de, van Beek TA. Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. Food Chem. 1 févr 2012,130(3):695–701
49. Laraba M, Serrat A, Ouassaa G. Etude in vitro de l'activité antioxydante des polyphénols isolés à partir d'une plante médicinale. Constantine ,05/06/2016

