

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



MÉMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de :

MASTER

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Thème

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE DU MARRUBE BLANC
(MARRUBIUM VULGARE.L)**

Présenté par :

BOUZOURENE Samia et BOURKACHE Samia

Soutenu publiquement le : 12 Juillet 2016, devant le jury composé de :

Mme	AYATI	Fadila	MCB	UMMTO	Présidente
Mlle	TOUZOUIRT	Saida	MAA	UMMTO	Examinatrice
Mme	KHALDI	Nassima	MAA	UMMTO	Examinatrice
Mlle	TALBI	Ouarda	MAB	UMMTO	Encadreur

Remerciement



Nous tenons tout d'abord à remercier dieu de nous avoir donné la force d'aller jusqu'au bout de ce travail, et de nous avoir entouré des nombreuses personnes qui nous ont aidé tout au long de notre parcours.

Ce travail a été effectué au laboratoire de chimie pharmaceutique du département chimie à l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Un grand merci pour M^{lle} TALBI ouarda promotrice de ce travail, pour sa présence, son aide et la patience quelle a manifestée à notre égard durant l'élaboration de ce mémoire. On remercie aussi M^{me} ABDELAOUI Karima (MAA), Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques, Département Agronomie, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou pour identifier notre plante.

Nos gratitude vont aussi à l'ensemble des membres du jury de thèse qui ont donné de leur temps pour examiner notre mémoire et apporter un regard pertinent sur notre travail. On remercie donc M^{me} AYATI Fadila, pour avoir accepté de présider notre jury, et M^{lle} TOUZOUIRT Saida et M^{me} KHALDI Nassima pour leurs aides dans la correction de ce mémoire. On associe également à ces remerciements, M^{lle} BEGGAZ Dahbia ingénieure de laboratoire chimie pharmaceutique, pour ses conseils et la patience dont il a fait preuve envers nous, aussi pour sa disponibilité, son soutien durant notre pratique.

Finalement, on remercie nos familles pour leur soutien et leurs encouragements qui nous ont permis de dépasser les moments difficiles et d'apprécier les moments heureux. Leur aide a été primordiale durant notre existence, et surtout tout au long du parcours qui nous a menés à ce projet.



Liste des abréviations et symboles

$H_3PW_{12}O_{40}$: acide phosphotungestique.

$H_3PM_{12}O_{40}$: acide phosphomolybdique.

W_8O_{23} : oxyde de tungstène.

MO_8O_3 : oxyde de molybdène.

Na_2CO_3 : carbonate de sodium.

CCM : chromatographie sur couche mince.

CH_3OH : méthanol.

$AlCl_3$: chlorure d'aluminium.

$NaCl$: chlorure de sodium.

HCl : acide chlorhydrique.

R_f : rapport frontal.

nm : nanomètre.

R : rendement.

mg EAG/g d'extrait : mg équivalent en acide gallique par gramme d'extrait.

$KMnO_4$: permanganate de potassium.

H_2SO_4 : acide sulfurique.

$FeCl_3$: chlorure de fer III (ou chlorure ferrique).

A : absorbance.

Me : masse de l'extrait après l'évaporation du solvant.

Ms : Masse de la plante sèche

NH_4OH : hydroxyde d'ammonium ou ammoniac.

TH : taux d'humidité.

M_1 : masse initiale d'échantillon (en g).

M_2 : masse de l'échantillon après séchage (en g).

μl : microlitre.

μg : microgramme.

$^{\circ}C$: Degré Celsius.

T : Teneur en composés phénoliques (mg EAG / g d'extrait sec de la plante).

C : Concentration de l'extrait (éthanolique ; méthanolique ; aqueux) équivalente à l'acide gallique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

ϵ : Le coefficient d'absorption en $ml \cdot \mu g^{-1} \cdot cm^{-1}$.

l : La largeur de cuve en cm.

V : volume d'extrait (ml).

M : poids sec d'extrait de la plante (g).

ATCC : American type culture collection.

KB: bacille de Koch.

GNO: gélose nutritive ordinaire.

Liste des tableaux

Tableau N° 1 : Différentes structures des flavonoïdes	10
Tableaux N° 2 : Liste des réactifs utilisés	18
Tableaux N° 3 : Rendement des extraits bruts des feuilles de Marrubium vulgare	30
Tableaux N° 4 : Résultats de screening phytochimique	32
Tableaux N° 5 : Résultats de la teneur en composés phénoliques totaux des extraits bruts méthanolique, éthanoliques, et aqueux de Marrubium vulgare.....	35
Tableaux N° 6 : Rapports frontaux et couleurs des taches avant et après ajout du permanganate de potassium	36
Tableaux N° 7 : Rapports frontaux et couleurs des taches avant et après ajout du chlorure d'aluminium $AlCl_3$ pour les flavonoïdes	38
Tableaux N° 8 : Rapports frontaux et couleurs des taches avant et après ajout du chlorure d'aluminium $AlCl_3$ pour les tanins	40
Tableaux N° 9 : Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différents concentrations de l'extrait aqueux de Marrubium Vulgare à différents souches bactériennes	42

Liste des figures

Fig. 1 :Marrubium vulgare	4
Fig. 2 : la feuille, la racine et la fleure du marrube blanc.....	6
Fig. 3 : Squelette moléculaire de base des Flavonoïdes	9
Fig. 4 : Tanin condensé	11
Fig. 5 : Tanin hydrolysable.....	11
Fig. 6 : Quelques exemples des alcaloïdes	12
Fig. 7 : Structure d'isoprène	13
Fig. 8 : Structure de β -Cadinène.....	13
Fig.9 : Structure de quelques diterpènes	14
Fig.10 : Structure de squalène	14
Fig.11 : Vue générale de la plante de Marrubium vulgare prise à partir du site d'étude	16
Fig.12 : Schéma des différentes étapes suivies lors de l'extraction des flavonoïdes	25
Fig.13 : Schéma des différentes étapes suivies lors de l'extraction des tanins.....	26
Fig.14 : Teneur en eau et en matière sèche du Marrubium vulgare.....	30
Fig.15 : Rendement d'extraction	31
Fig.16 : Résultats de screening phytochimique.....	33
Fig.17 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux	34
Fig.18 : Résultats de la CCM des polyphénols totaux	35
Fig.19 : Rendement en flavonoïdes des feuilles de Marrubium vulgare.....	37
Fig.20 : Rendement en tanins des feuilles de Marrubium Vulgare.....	38
Fig.21 : Résultats de la CCM pour les flavonoïdes.....	39

Fig.22 : Résultats de la CCM pour les tanins..... 40

Fig. 23 : Zones d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait aqueux des feuilles
de Marrubium Vulgare 41



Sommaire

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Aperçu bibliographique sur la plante étudiée : Marrubium vulgare	
Introduction	2
1/Historique et découverte.....	2
2 /Description de la famille des Lamiacées (Labiées)	3
2.1/ Caractères principaux	3
3 / Le Genre Marrubium.....	3
3.1 / Répartition géographique	3
3.2/Etymologie	4
3.3/ Dénomination internationale	4
3.4 /Description botanique.....	5
3.4.1/ La racine	5
3.4.2/ La tige	5
3.4.3/ Les feuilles.....	5
3.4.4/ Appareil reproducteur (la fleur)	5
3.4.4.1/ Le calice	5
3.4.4.2/ La Corolle	5
3.4.4.3/ L'androcée	6
3.4.5 / Le fruit	6
4/ Utilisations thérapeutiques du marrube blanc	6

5/ Contre-indications et effets indésirables	7
6 / Travaux antérieurs	7

Chapitre II : Les métabolites secondaires

Introduction	8
1/Composés phénoliques	8
1.1/Flavonoïdes.....	8
1.1.1 /Définition	8
1.1.2 /Structure des flavonoïdes	9
1.1.3/Classification des flavonoïdes	9
1.2 /Tanins	11
1.2.1 / Définition	11
1.2.2 / Structure et classification.....	11
2/Alcaloïdes	11
2.1 /Définition.....	11
2.2 / Propriétés des alcaloïdes.....	12
2.3/Structure des alcaloïdes	12
3/Terpénoïdes	12
3.1 /Définition	12
3.2 / Structure des terpénoïdes.....	12
3.3 / Classification	13
3.3.1 /Sesquiterpène	13
3.3.2/Diterpènes	13
3.3.3/Triterpènes	14

3.3.4/Produits de dégradation des triterpènes	15
3.3.4.1/Stéroïdes.....	15
3.3.4.2/Saponines (groupe des stéroïdes).....	15
4/Huiles essentielles	15

Chapitre III : Matériels et méthodes

1 /Matériels.....	16
1.1 / Matériel végétal	16
1.1.1 /Récolte et séchage.....	16
1.1.2 /Position systématique de la plante	17
1.2/Evaluation du taux d'humidité du matériel végétal	17
1.3/Réactifs utilisés.....	18
2 / Méthodes	19
2.1/Préparation des extraits.....	19
2.2/Principe et la méthode d'extraction.....	19
2.2.1/Préparation de l'extrait aqueux	19
2.2.2/Préparation de l'extrait éthanoloique, méthanoloique	19
2.2.3/Rendement de l'extrait brut	20
3/Méthodes d'analyse	20
3.1/ Screening phytochimique	20
3.2 /Tests sur les trois extraits (éthyanoloique, méthanoloique,aqueux	20
3.3/Dosage quantitatif par des réactions colorimétriques.....	22
3.3.1 /Dosage des composés phénoliques totaux	22
3.3.2 / Expression des résultats	23

3.3.3 /Séparation des polyphénols totaux par Chromatographie sur Couche Mince (CCM.....	24
3.4 /Extraction des flavonoïdes.....	25
3.5/ Extraction des tanins.....	26
3.6/ Séparation des flavonoïdes par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	27
3.7/Séparation des tanins par Chromatographie sur Couche Mince (CCM.....	27
3.8/ Activité antibactérienne	28
3.8.1/Souches bactériennes utilisées	28
3.8.2/ Milieux de culture utilisés.....	28
3.8.3/ Méthode de diffusion en milieu gélosé.....	28
3.8.3.1/ Préparation de l'inoculum bactérien	28
3.8.3.2/ Protocole expérimental	29

Chapitre VI : Résultats et discussion

1/ Résultats	30
1.1/ Taux d'humidité de la plante.....	30
1.2/ Rendement.....	30
1.3/ Résultats de screening phytochimique	32
1. 4/ Résultats de dosage quantitatif	34
1.4.1/ Dosage des polyphénols	34
1.5/ Séparation des polyphénols totaux par la chromatographie sur couche mince (CCM.....	35
1.6/ Teneur en flavonoïdes	36

1.7 / Teneur en tanins	37
1.8/ Chromatographie sur couche mince des flavonoïdes	38
1.9 /Chromatographie sur couche mince des tanins	39
1.10/Résultats des tests microbiologiques	40
Conclusion générale	41

Références bibliographiques

Glossaire

Annexes

Introduction

A travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base: nourritures, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité [1].

Dans le monde, près de 80% de la population a recours aux plantes médicinales par manque d'accès aux médicaments prescrits [2]. Une plante est dite médicinale lorsqu'au moins une partie possède des propriétés curatives ou préventives d'une ou de plusieurs maladies [3].

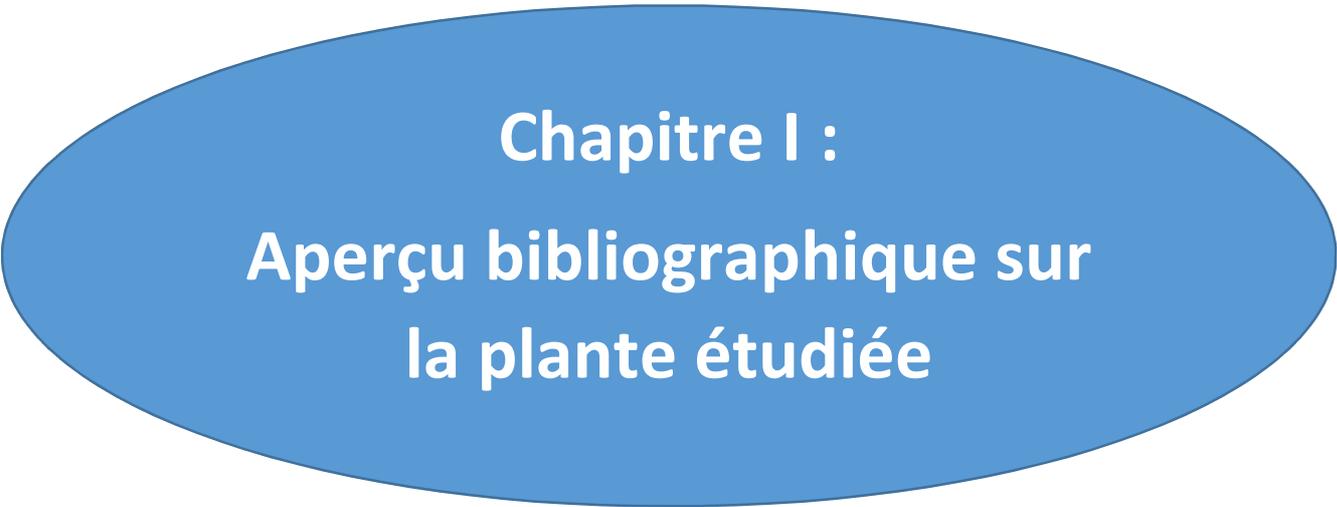
Parmi ces différentes familles on trouve les lamiacées qui sont l'une des familles connues depuis longtemps pour leurs propriétés médicinales, aromatique ou culinaire. Elle renferme différentes plantes telles que : la menthe, le basilic, la sauge et aussi le marrube blanc (*marrubium vulgare*) [5].

Dans ce travail nous nous sommes intéressées à l'étude de Marrube blanc (*M.vulgare*) car c'est une plante qui est fréquente dans toute l'Algérie, plus précisément dans notre région : la Kabylie. Cette espèce a des vertus médicinales variées et nos ancêtres l'utilisaient pour guérir différentes maladies, fait que beaucoup de gens ignorent de nos jours. A travers notre étude sur le marrube, nous essayerons de confirmer ses vertus et de montrer son importance dans la vie de l'être humain.

Notre travail a été divisé en deux parties, la première concernant l'étude bibliographique, comprend un chapitre sur l'étude botanique de l'espèce *Marrubium vulgare* et un autre chapitre sur les principaux métabolites secondaires qui existent dans les plantes médicinales d'une manière générale.

La deuxième partie, est consacrée à l'étude phytochimique des différents extraits de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* et l'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux.

Enfin, on termine par une conclusion générale dans laquelle sont récapitulés les principaux résultats obtenus.



Chapitre I :
Aperçu bibliographique sur
la plante étudiée

Introduction

D'après la X^{ème} édition de la Pharmacopée française, les plantes médicinales sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne, dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses [6]. Le marrube commun ou marrube blanc est une plante qui appartient à la famille des lamiacées connu depuis des siècles pour son efficacité à guérir la toux. Cette espèce a des vertus médicinales variées et nos ancêtres l'utilisaient pour guérir différentes maladies, fait que beaucoup de gens ignorent de nos jours.

1/Historique et découverte

En Egypte, le Marrubium dérive du « HORUS » qui est un dieu égyptien, connu comme la graine d'Horus, considérée dans l'antiquité en Grèce comme étant une plante médicinale et cela depuis Hippocrate [7].

Le marrube blanc était très connu des Grecs et des anciens Arabes [5].

Dioscoride ; un médecin, pharmacologue et botaniste grec, préconisait le marrube blanc en décoction, pour soigner la toux.

Antonius Castor (médecin romain qui vécut au I^{er} siècle) connaissait le marrube blanc comme une plante spécifique aux affections de l'appareil respiratoire et **Pline l'Ancien** (écrivain et naturaliste romain du I^{er} siècle) a énuméré de nombreuses préparations curatives utilisant le marrube dans ses écrits.

Au Moyen Âge, on employait couramment le marrube blanc dans le traitement des mêmes affections que dans l'Antiquité. A cette époque, **Hildegarde de Bingen (1098-1179)** religieuse bénédictine mystique, compositrice et botaniste, en disait dans ses ouvrage que :

«Si on a les entrailles malades et en mauvais état, faire cuire du marrube avec du vin et une quantité suffisante de miel; une fois l'ensemble cuit, conserver dans un pot et boire froid: les entrailles retrouveront la santé».

Pour **Jean-Emmanuel Gilbert** (1741-1814) homme politique et botaniste français, le marrube blanc est considéré, dans son livre paru en 1798, "l'Histoire des plantes d'Europe", comme "l'une des meilleures plantes d'Europe"[7].

2/Description de la famille des Lamiacées (Labiées)

La famille des lamiacées comporte 260 genres et entre 6500 à 7000 espèces qui se présentent sous forme d'herbes ou arbustes, elles sont considérées comme aromatiques, poilues et glanduleuses [7]. C'est une famille exceptionnellement homogène: une lamiacée est très facile à reconnaître mais elle est rare, son aire de dispersion est extrêmement étendue [8].

2.1/Caractères principaux

- Les Lamiacées sont des plantes très adaptées à la **sécheresse**, elles sont herbacées, annuelles ou vivaces, elles poussent quelquefois sous forme de petits arbrisseaux.
- La tige est quadrangulaire, les feuilles simples de formes très variables, sont opposées. Certaines feuilles sont enroulées par-dessous, elles sont souvent coriaces et épaisses pour mieux résister à la sécheresse.
- Ce sont des plantes **aromatiques** très prisées en cosmétique, en aromathérapie et en phytothérapie. L'huile essentielle se trouve dans des poils, glandes ou poches selon les plantes, et se localise sous la cuticule (membrane qui protège les feuilles). Elles laissent une odeur caractéristique quand on les froisse. Ce sont des plantes également très **mellifères** [9].

3/Genre Marrubium

Le genre Marrubium comporte 40 espèces, répandues principalement le long de la méditerranée[10].En Algérie, on retrouve 6 espèces différentes au sein de ce même genre : Marrubiumvulgare, Marrubiumsupinum, Marrubiumperegrinum, Marrubium alysson, MarrubiumalyssoidesPomelet Marrubiumdeserti de Noé [11].

3.1/Répartition géographique

L'espèce est originaire d'Europe méridionale ; on la trouve à l'état spontané dans les sites abandonnés, surtout en station chaude et ensoleillée [12]. Le marrube blanc(**Fig. 1**) depuis longtemps répandu un peu partout dans l'hémisphère Nord, notamment aux États-Unis et au Canada où il est naturalisé [13].Le Marrube blanc est une plante qui se trouve Presque dans toute l'Europe, en Asie, et surtout très répandue dans toute l'aire méditerranéenne notamment au Maroc, Tunisie, Libye, Egypte et en Algérie [5]. C'est une espèce nitrophile, qui est habituellement rencontrée au voisinage des habitations, au pied des murs, en bordure des chemins et dans les terrains vagues [14].



Fig.1: Marrubium vulgare

3.2/Etymologie

Le nom botanique latin de la plante "Marrubium" proviendrait de "Maria urbs" une ancienne ville d'Italie. D'autres étymologistes avancent que son origine viendrait de l'hébreu "marrob" désignant un jus amer [5].

3.3/Dénomination internationale

Nom botanique : Marrubiumvulgare L.

Nom commun : Marrube blanc [15].

Nom français : Marrube [5], marrube commun [16]. Ainsi on trouve : bonhomme, herbe à la vierge, marrochemin[17].

Nom allemand : Weisser andron[16].WeiBerAndom[14].

Nom espagnol : Marrubie[13].

Nom anglais: Common Horehond[13].

Nom arabe: Ifzi, ifzyi[18]. Timeriout, timersat[5].

Nom Kabyle: Beruit, mariouet, meriut, meriwet, mariout, merriut, merriwut[5]. Farasiyun, sennar, umdatat-tabib[18].

3.4/Description botanique

3.4.1/Racine

La racine est simple, ligneuse, garnie de plusieurs fibres (Fig. 2) [5].

3.4.2/Tige

Les tiges du marrube blanc peuvent atteindre jusqu'à 50 cm de longueur et 7 mm de largeur ; les jeunes tiges sont recouvertes d'abondants poils duveteux blanchâtres ; les plus âgées sont gris-vert et les poils qui les recouvrent sont moins nombreux [14]. Elles sont carrées, dressées, robustes et feuillues [15], et sont dites « tétragones » ou quadrangulaires, cotonneuses, blanches et tomenteuses [5].

3.4.3/Feuilles

Les feuilles du marrube blanc sont opposées et pétiolées, elles sont entières et un peu cordées à la base ; leur forme générale est ovale ou arrondie(Fig. 2). Ainsi elles sont feutrées, cotonneuses, et de couleur blanchâtre [5]. Les feuilles du marrube pétiolées ont un limbe mesurant 1,5-4 cm de longueur et 1-3,5 cm de largeur ; elles présentent des bords dentés à crénelés et sont recouvertes de poils blancs, fins et d'aspect vert-gris foncé.[14]. De plus, les feuilles sont gaufrées [15].

3.4.4/Appareil reproducteur (la fleur)

Les fleurs sont petites et forment des amas danses, axillaires, sessiles et réunies en glomérules à l'aisselle des feuilles [14]. Elles rangent de délicats verticilles au long de la tige ; blanches et dotés d'une corolle soyeuse et bilabiées, elles s'épanouissent de la mi-avril à la fin aout [15].

3.4.4.1/Calice

Il est velu et laineux ; possède dix dents inégales et crochues dont cinq, dites commissurales, sont un peu plus courtes et toujours terminées en pointe épineuse [5]. Le calice à 5-10 dents et 10 nervures est très poilue à l'intérieur du tube [14].

3.4.4.2/Corolle

Elle est blanche, bilabiée.la lèvre supérieure est presque plane, entière ou bifide alors que la lèvre inférieure est ouverte et trifide [5].

3.4.4.3/Androcée

L'androcée est à quatre étamines qui sont renfermées dans le tube de la corolle [5].

3.4.5/Fruit

Les fruits consistent en quatre akènes lisses et glabres murissent en automne ; tout comme les fleurs, ils dégagent un parfum intense, musqué, et ont une saveur amère [15]. Ainsi qu'il est visible au fond du calice persistant [5].



Fig. 2 : La feuille, la racine et la fleur du marrube blanc.

4/Utilisations thérapeutiques du marrube blanc

Cette plante est traditionnellement utilisée pour le traitement de divers maux : sifflements respiratoires, maladies urinaires, otites, ophtalmies [19].

En Algérie, le marrube blanc est utilisé en médecine folklorique contre la diarrhée, le diabète, le rhumatisme, le rhume et les douleurs respiratoires [11].

Marrubium vulgare possède des effets hypoglycémiants et hypolipidémiants (par une stimulation de sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatique), vasorelaxant, antihypertensif, antioxydant, antimicrobien, antispasmodique, anti-inflammatoire et analgésique[20].

Il possède les activités tonique, aromatique, stimulante, expectorante, diaphorétique et diurétique. C'est également un ingrédient des pastilles contre la toux, par exemple, Ricola®. Il a été très employé dans les affections hépatiques. Le principe actif principal de cette plante a été identifié en tant que marrubiine, un diterpène labdane furanique[21].

5/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 [22].

6/Travaux antérieurs

Les résultats des études phytochimiques effectuées par **Ashkennazy et al, 1983** sur le genre Marrubium au regard des données bibliographiques ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes [23].

L'étude de **Graham- Solomons (1994)** sur l'extrait acétonique de la partie aérienne de M.vulgare, a permis d'isoler la marrubiine [24]. Par la suite les chimistes Iraniens ont démontré que cette espèce est connue par l'élaboration des huiles essentielles [25].

Djahra Ali Boutelis, (2010) a particulièrement étudié l'espèce Marrubium vulgare. Son étude est abouti à l'identification des principes actifs majeurs, les flavonoïdes et les tanins qui possèdent diverses activités biologiques telles que les activités antibactériennes, antifongique et antihépatotoxique [22].



Chapitre II :
Les métabolites secondaires

Introduction

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser des diverses substances pour se défendre. Ces substances prennent la nomenclature des métabolites secondaires [25].

Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés anti oxydantes, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes [26].

1/Composés phénoliques

Les polyphénols constituent un groupe largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante [27].

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'un cycle aromatique (benzoïque) portant au moins un groupement hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction chimique (éther, ester, sucre...) [28].

1.1/Flavonoïdes

1.1.1/Définition

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) représente une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [29].

On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires [30], où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Ils jouent un rôle important dans la protection des plantes [3].

1.1.2/Structure des flavonoïdes

Flavonoïde, est un terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 atomes de carbone qui est fait de deux cycles phényles C₆, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C₆-C₃-C₆). Ce dernier est situé entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (cycle central). Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et dans le cycle B de 2' à 6' (**Fig. 3**)[3].

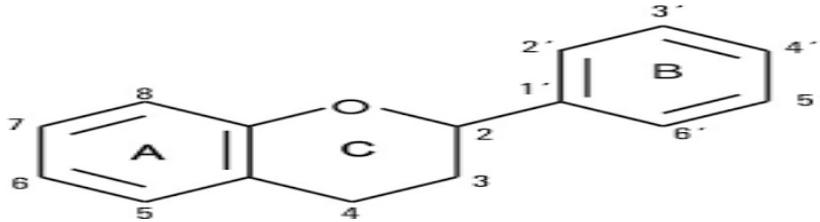
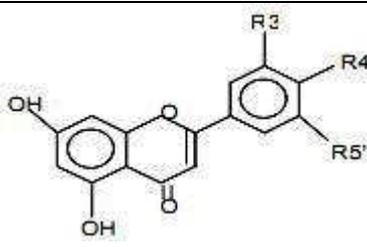
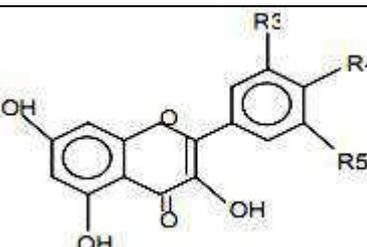
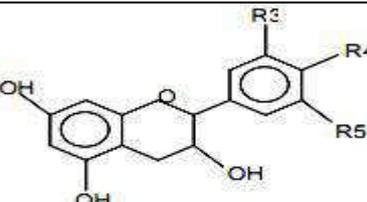
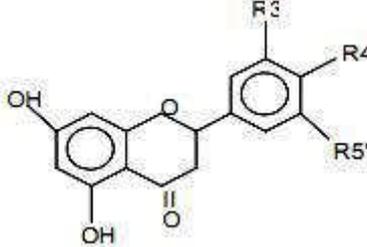
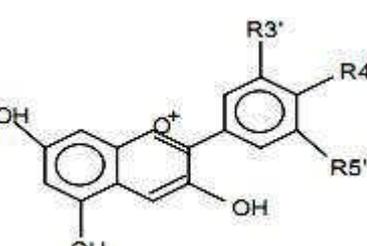
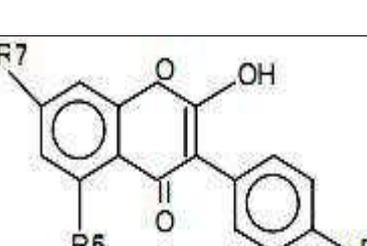


Fig.3 : Squelette moléculaire de base des flavonoïdes.

1.1.3/Classification des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, ils peuvent être regroupés en plusieurs classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (**Tableau N°1**) : les hétérosides flavonoïdiques, les anthocyanes, les isoflavonoïdes et les flavonoïdes au sens strict comprenant les **flavones**, les **flavonols**, les **dihydroflavonols**, les **flavanones** ainsi que les **aurones** et les **chalcones** [3].

Tableau N° 1 : Différentes structures des flavonoïdes.

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzeine

1.2/Tanins

1.2.1/Définition

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres et les fruits (raisin, datte, café, cacao...), ce sont des substances de saveurastringente ayant la propriété de tanner la peau et de se combiner aux protéines animales par des liaisons hydrogènes [31].

1.2.2/Structure et classification

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs deux groupes de tanins, basés sur des différences structurales: les tanins non hydrolysables ou tanins condensés (Fig. 4) et les tanins hydrolysables (Fig. 5) [32].

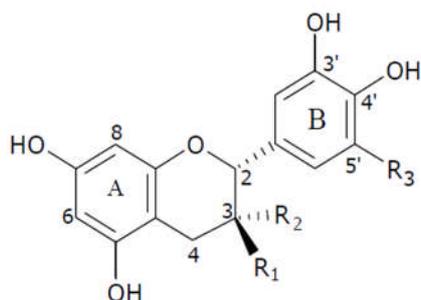


Fig. 4 : Tanin condensé.

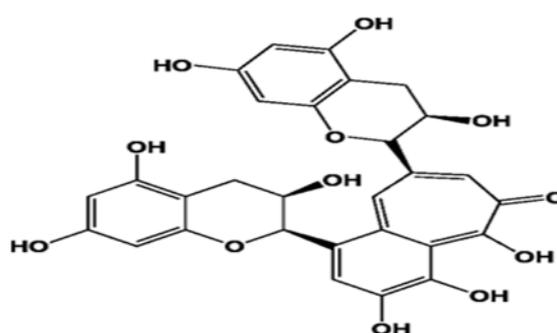


Fig. 5 : Tanin hydrolysable.

2/Alcaloïdes

2.1/Définition

Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale à caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe. Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles [33].

2.2/Propriétés des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont caractérisés par une solubilité faible dans l'eau, facilement solubles dans l'alcool et peuvent donner des colorations spécifiques avec certains réactifs (réactifs de Mayer, de Dragendorff, de Wasicky, de Bouchardat). Ils exercent en général de puissante action pharmacologique [25].

2.3/Structure des alcaloïdes

La plupart des alcaloïdes sont dérivés des acides aminés tels que le tryptophane, l'ornithine, la lysine, l'asparate, l'antranilate, la phénylalanine et la tyrosine. Ces acides aminés sont décarboxylés en amines et couplés à d'autres squelettes carbonés [34].

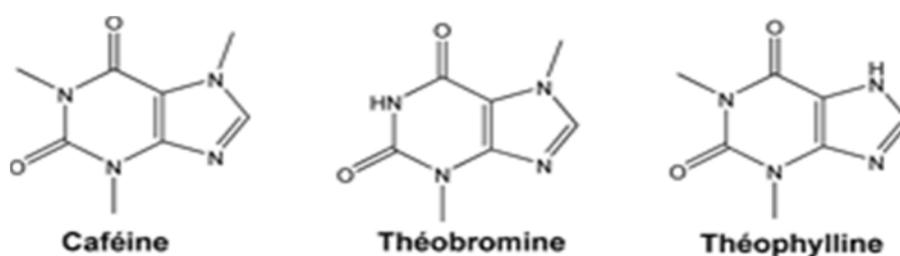


Fig. 6 : Quelques exemples d'alcaloïdes.

3/Terpénoïdes

3.1/Définition

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale. Synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux [35].

3.2/Structure des terpénoïdes

Les terpènes sont des composés hydrocarbonés naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte. Leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ (Fig. 7) dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (de 1 à 8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base des terpénoïdes est l'isoprène de formule C_5H_8 [36].

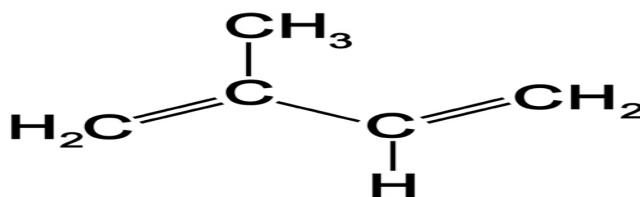


Fig. 7 : Structure d'isoprène.

3.3/Classification

3.3.1/Sesquiterpène

Les sesquiterpènes forment une série de composés qui renferment 15 atomes de carbones, ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures comme le β -Cadinène (Fig. 9), ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme : les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature. Les sesquiterpènes et les monoterpènes sont souvent en mélange dans les huiles essentielles des plantes. Ils peuvent être acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques ou polycycliques [36].

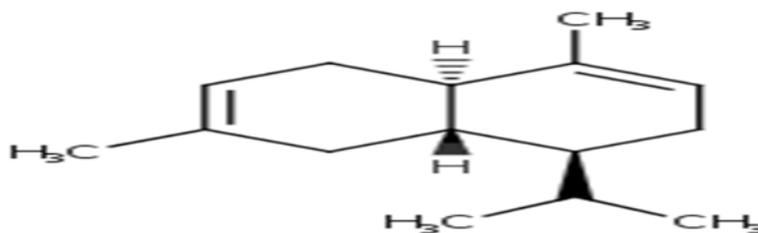


Fig. 8 : Structure de β -Cadinène.

3.3.2/Diterpènes

Les diterpènes sont des substances avec 20 atomes de carbone (C_{20}) élaborées à partir de 4 unités d'isoprène. Ils sont très répandus chez les végétaux supérieurs, ils sont aussi présents chez certains insectes et chez divers organismes marins.

Ils peuvent être acycliques comme le phytol ; dont il est le représentant le plus connu de la chlorophylle et des vitamines K et E. La (Fig. 9) ci-dessous rassemble à la structure de quelques diterpènes [36].

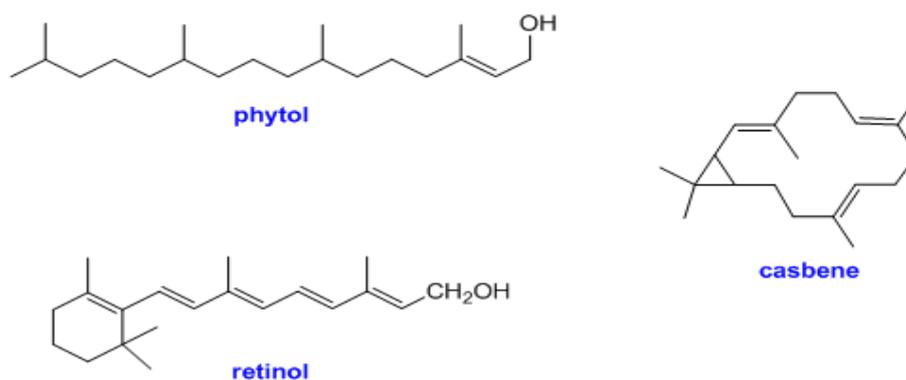


Fig.9 : Structure de quelques diterpènes.

3.3.3/Triterpènes

Les triterpènes sont des molécules à 30 atomes de carbone. Ils ont comme précurseur le squalène (**Fig. 10**). Il y a plus de 1700 triterpènes dans la nature [36]. La plupart des triterpènes sont des alcools, sous forme libre ou glycoside (les saponines) ou ester. Les triterpènes libres sont des composants principaux des résines ou du latex des végétaux, la vitamine D est un produit dérivé de triterpène [37].

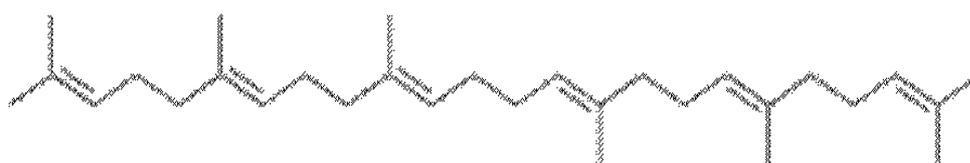


Fig. 10 : Structure de squalène.

3.3.4/Produits de dégradation des triterpènes

3.3.4.1/Stéroïdes

Les stéroïdes ne sont pas des terpènes mais des composés de biodégradation de triterpènes, très largement répandus dans le monde vivant, se rencontrent aussi bien chez les bactéries, les champignons et les plantes supérieures [28].

3.3.4.2/Saponines (groupe des stéroïdes)

Les saponines sont sous forme d'hétérosides à l'état naturel. Les propriétés physico-chimiques les plus caractéristiques des saponines sont les modifications de la tension superficielle et le pouvoir moussant. Elles sont largement répandues dans le monde végétal, ces composés assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique [37].

4/Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des composants liquides et hautement volatiles des plantes, marqués par une forte et caractéristique odeur. Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs, feuilles, des écorces, des bois, des racines, des rhizomes, des fruits, des graines [38].

Les huiles essentielles ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales et antiparasitaires d'où leur vaste utilisation dans les domaines pharmaceutique, alimentaire et cosmétique. Néanmoins, une seule huile peut avoir plusieurs utilisations à la fois [39].

A blue oval shape centered on a white background, containing the chapter title text.

Chapitre III :
Matériels et méthodes

1/Matériels

1.1/Matériel végétal

1.1.1/Récolte et séchage

La récolte de la plante du marrube blanc (*marrubium vulgare*) (**Fig. 11**) a été faite au mois d'avril 2016 dans la région de Draa Ben Khedda située à 11 km à l'ouest de Tizi Ouzou et à environ 90 km à l'est d'Alger.

Les feuilles ont été séchées à l'ombre, durant 2 semaines dans un endroit bien aéré, à une température ambiante et à l'abri de la lumière, pour préserver le maximum l'intégrité des molécules. Le matériel végétal séché est ensuite réduit en poudre à l'aide d'un broyeur [7].



Fig.11 : Vue générale de la plante de *Marrubium vulgare* prise à partir du site d'étude (Draa Ben Khedda).

1.1.2/Position systématique de la plante

L'identification de la plante a été faite par M^{elle} : Abedllaoui Karima (MAA), Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques, Département Agronomie, Université Mouloud Mammeri de TiziOuzou.

Selon Spichiger et al. 2004, Marrubium vulgare appartient au :

Règne : Végétale

S / règne : Plantes vasculaire

Division : Magnoliophytes

Classe : Eudicotylédones.

S / Classe : Gamopétale.

Ordre : Lamiales.

Famille : Lamiacées.

Genre : Marrubium.

Espèce :Marrubium vulgare L [7].

1.2/Evaluation du taux d'humidité du matériel végétal

La détermination de la teneur en eau du Marrubiumvulgare a été réalisée par séchage de 3 g de la plante (feuilles) fraîche introduite dans une étuve à 120°C, jusqu'à stabilisation de la masse (environ **4h**).

Le Calcul du pourcentage du taux d'humidité TH est donné selon la formule :

$$TH = \frac{(M_1 - M_2)}{M_1} \times 100$$

M₁ : Masse initiale d'échantillon (en g) ;

M₂ : Masse après séchage (en g) ;

TH : Taux d'Humidité en %.

1.3/Réactifs utilisés

Les différents réactifs utilisés ne sont pas purifier, ils sont enregistrés dans le **Tableau N° 2**

Fournisseur	Réactif	Formule chimique
SIGMA- ALDIRICH^R	Méthanol	CH ₃ OH
	Ethanol	C ₂ H ₅ OH
	Butanol-2	C ₄ H ₇ OH
	Acide chlorhydrique	HCl
	Anhydride Acétique	C ₄ H ₆ O ₃
	Carbonate de soduim	Na ₂ CO ₃
Prolabo^R	Dichlorométhane	CH ₃ Cl ₂
	Chloroforme	CHCl ₃
	Acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂
	Iodure de potassium	KI
	Réactif de Folin Ciocalteu	/
Panreac^R	Chlorure de Sodium	NaCl
	Chlorure ferrique	FeCl ₃
Biochem^R	Acide Sulfurique	H ₂ SO ₄
Riedel de Haen^R	Iode	I ₂

2/Méthodes

2.1/Préparation des extraits

Les extractions solide / liquide de cette plante ont été réalisées selon le mode de préparation : **macération**.

2.2/Principe de la méthode d'extraction

L'extraction des principes actifs est effectuée par macération, qui est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. Elle se fait à température ambiante. Elle est utilisée couramment dans l'extraction des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins, des terpènes... [40].

2.2.1/Préparation de l'extrait aqueux

5g de la drogue (feuilles) est macérée pendant 24 heures à température ambiante, dans 100 ml d'eau. L'extraction est refaite 3 fois avec renouvellement du solvant. Les macéras sont réunis et filtrés sur papier filtre. Le solvant est éliminé du filtrat sous vide à l'aide d'un Rota vapeur. Après l'évaporation du solvant, l'extrait sec est pesé puis solubilisé dans l'eau [41].

2.2.2/Préparation des extraits éthanolique et méthanolique

5g de la drogue (feuilles) est macérée pendant 24 heures à température ambiante, dans un mélange éthanol-eau, (méthanol/eau) (70:30 v/v) respectivement [41]. L'extraction est refaite 3 fois avec renouvellement du solvant. Les macéras sont réunis et filtrés sur papier filtre. Le solvant est éliminé du filtrat sous vide à l'aide d'un rota vapeur. Après l'évaporation du solvant, l'extrait sec est pesé puis solubilisé dans l'éthanol [41].

2.2.3/Rendement de l'extrait brut

Le rendement de l'extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé *via* l'équation :

$$R \% = (Me/Ms)*100$$

R % : Rendement en %.

Me: Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant.

Ms : Masse de la plante sèche.

3/Méthodes d'analyse

3.1/Screening phytochimique

Le screening phytochimique représente l'ensemble des techniques qualitatives permettant la détermination des différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques. Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais les principaux sont les polyphénols totaux y compris les flavonoïdes, les anthocyanes, les tannins, les coumarines, les alcaloïdes, les saponosides, les stéroïdes, les stérols, les terpènes...etc [42].

Le screening phytochimique a été réalisé tant sur les phases aqueuses qu'organiques par des réactions usuelles à l'aide des réactifs de caractérisation classiques [43].

3.2/Tests sur les trois extraits :(aqueux, éthanolique et méthanolique)

➤ Amidon

Le test effectué consiste à : Chauffer 5 ml de l'extrait (aqueux, éthanolique, méthanolique) avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition ; Ajouter le réactif d'amidon .Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée [8].

➤ **Saponosides**

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse [3]. Leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait (aqueux, éthanolique, méthanolique) après l'agitation, le mélange est reposé pendant 20 minutes, et la teneur en saponosides est évaluée:

Pas de mousse = test négatif

Mousse moins de 1cm = test faiblement positif

Mousse de 1-2cm = test positif

Mousse plus de 2cm = test très positif

➤ **Tanins**

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1 ml de l'extrait (aqueux, éthanolique, méthanolique) 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de $FeCl_3$ diluée 10 fois. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins [44].

➤ **Flavonoïdes**

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait (aqueux, éthanolique, méthanolique) avec 1 ml d'HCl concentré, et 0,5g de tournure de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes [27].

➤ **Alcaloïdes**

Dans deux tubes à essai, introduire 1 ml de l'extrait à analyser (aqueux, éthanolique, méthanolique). Acidifier le milieu par quelques gouttes de HCl, et ajouter quelques gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube, et quelques gouttes de réactif de Wagner dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement révèle la présence d'alcaloïdes [45,46].

➤ **Stérols et triterpènes : La réaction de Lieberman Burchardt**

Dans un tube à essai, introduire 5 ml de l'extrait à analyser (aqueux, éthanolique, méthanolique), ajouter 5ml d'anhydride acétique, 5ml de chloroforme et 1 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré dans la paroi du tube sans agiter. Laisser reposer 20 min.

La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides, et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes [44].

➤ **Terpénoïdes : Test de Slakowski**

Dans un tube à essai, ajouter à 2,5ml d'extrait (aqueux, éthanolique, méthanolique) 0,4ml de chloroforme et 0,6ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase indique la présence des terpénoïdes [45,46].

➤ **Glycosides cardiaques**

2 ml de chaque extrait (aqueux, éthanolique, méthanolique) a été dissous avec 2 ml de chloroforme, l'acide sulfurique concentré a été ajoutée avec précaution pour former une couche rougeâtre foncée à l'interface de l'anneau stéroïde, qui indique la présence de glycosides cardiaques [47].

➤ **Anthocyanes**

Les anthocynes sont révélés par l'ajout de 1 ml d'extrait (aqueux, éthanolique, méthanolique), 3 ml de H_2SO_4 concentré et 1 ml de NH_4OH , si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu en milieu basique, on peut conclure la présence des anthocyanes [48].

3.3/Dosage quantitatif par des réactions colorimétriques

3.3.1/Dosage des composés phénoliques totaux

Les composés phénoliques totaux ont été estimés selon la méthode colorimétrique basée sur le réactif de Folin Ciocalteu.

Le réactif est formé d'acide phosphotungestique ($\text{HPW}_{12}\text{O}_{40}$), et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$) qui sont réduits lors de l'oxydation des composés phénoliques en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_3).

Pour cela 2 ml de l'extrait brut (aqueux ; éthanolique ; méthanolique) sont mélangés à 10 ml du réactif de Folin. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 3 minutes. Ensuite 8 ml de la solution carbonate de sodium (Na_2CO_3) 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; selon la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon I C$

Avec :

A : absorbance

ϵ : Le coefficient d'absorption en $\text{ml} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

I : La largeur de cuve en cm.

C : La concentration de la solution en $\mu\text{g/ml}$.

On prépare dans les mêmes conditions un témoin (solution à blanc) 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 200 $\mu\text{g/ml}$) [49].

3.3.2/Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (0-200 $\mu\text{g/ml}$) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/mg}$).

Le total des composés phénoliques est déterminé selon l'équation suivante :

$$T = C \cdot V / M$$

T : Représente le total des composés phénoliques (mg EAG /g d'extrait sec de la plante).

C : Concentration des extraits (aqueux ; éthanolique ; méthanolique) équivalente à l'acide tannique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

V : Volume des extraits (ml).

M : poids sec d'extrait de la plante (g) [50].

3.3.3/Analyse des polyphénols totaux par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés. De ce fait nous avons opté pour cette technique dans le but de caractériser les produits purs isolés des feuilles.

L'analyse repose sur les mécanismes d'adsorption, de partage ou d'échange d'ions ou sur une combinaison de ces mécanismes, et elle s'effectue par migration (développement) de solutés à travers la couche mince (phase stationnaire) dans un solvant ou un mélange de solvants appropriés (phase mobile) [51].

Les extraits ont été analysés par Chromatographie sur Couche Mince dont la phase mobile choisie est 8ml du dichlorométhane en tant que système de solvants pour les extraits polaires.

La révélation est faite sous une lampe à UV qui met en évidence la présence des flavonoïdes. La confirmation de la présence des taches à été réalisée par l'ajout de permanganate de potassium (KMnO_4) à 0.01M. Le permanganate de potassium provoque le changement de la couleur des taches obtenues [51].

3.4/Extraction des flavonoïdes [22].

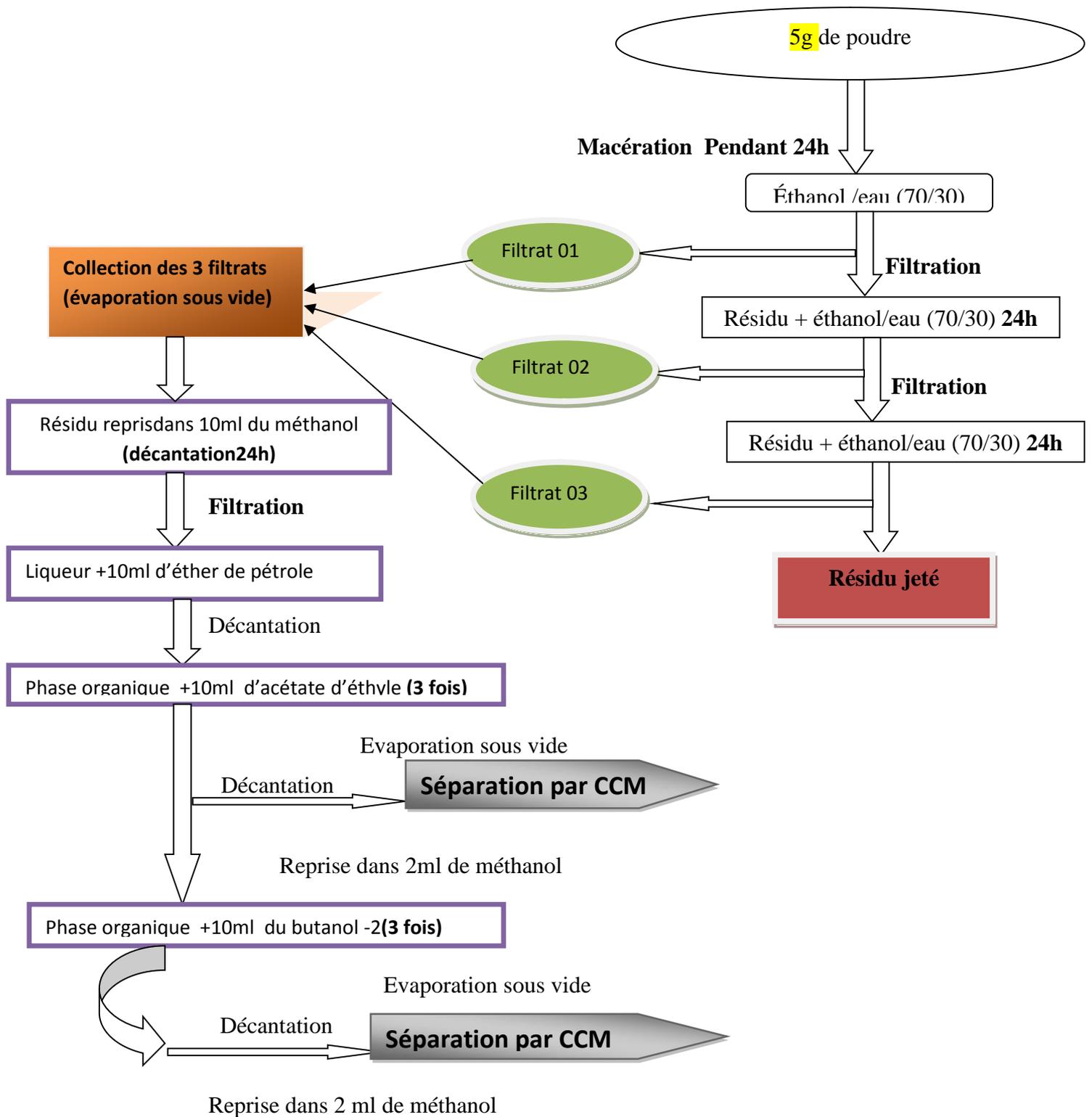


Fig.12 : Schéma des différentes étapes suivies lors de l'extraction des flavonoïdes.

3.5/Extraction des tanins [55].

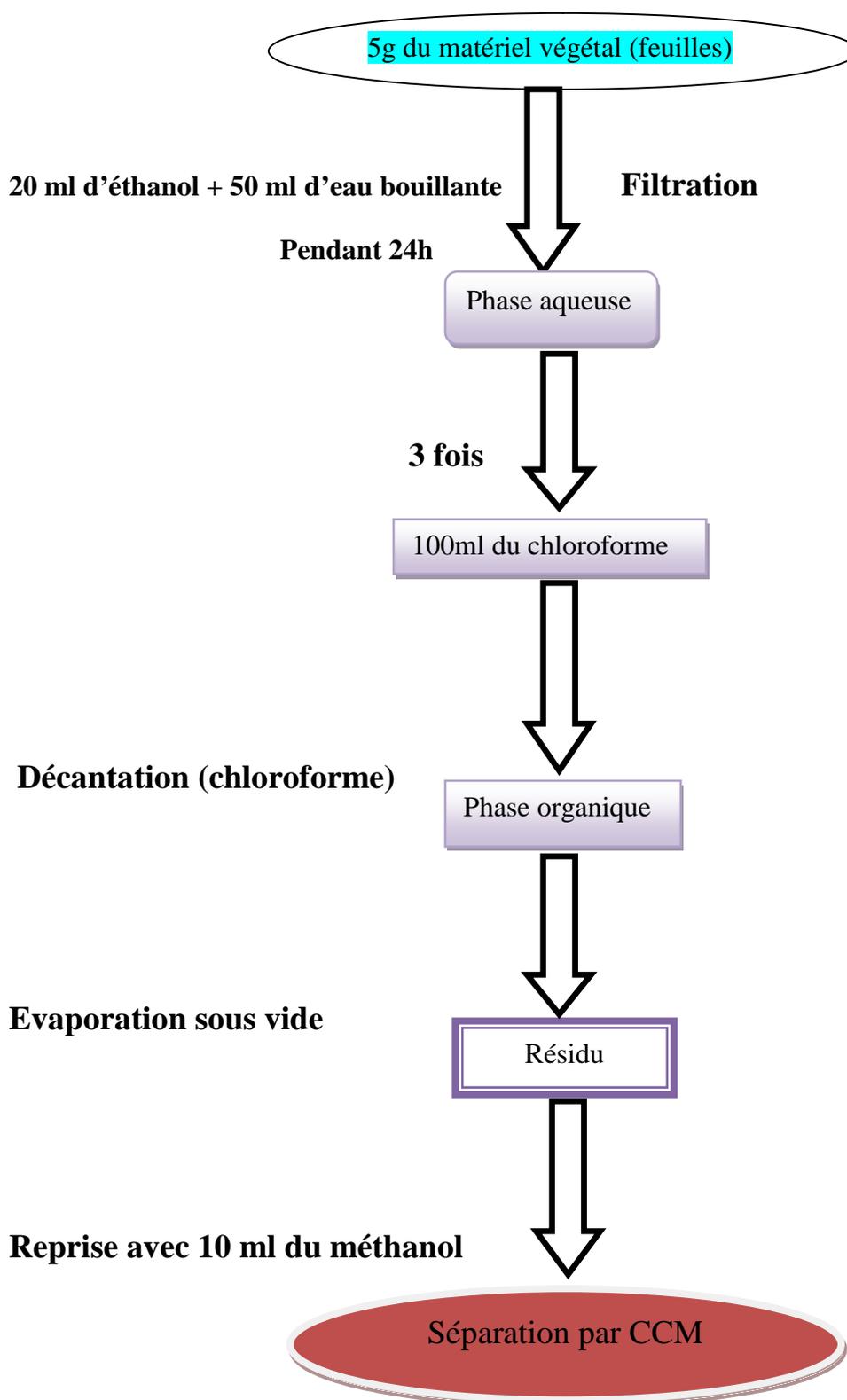


Fig. 13 : Schéma des différentes étapes suivies lors de l'extraction des tanins.

3.6/Analyse des flavonoïdes par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Par ses faibles contraintes techniques, son emploi simple et son coût modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés.

Les flavonoïdes extraits ont été analysés par Chromatographie sur Couche Mince dont la phase mobile choisie est un mélange d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau (5v/2v/1v) [50].

La révélation est faite sous une lampe à UV 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 [22].

3.7/Analyse des tanins par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Après une série d'essais réalisés dans le but d'une recherche d'un éluant favorable pour la séparation des différents composants des tanins de *Marrubium vulgare*, nous avons opté pour chloroforme qui nous semble comme étant le meilleur éluant.

L'analyse est effectuée par dépôt de spots circulaires d'environ 2 mm de diamètre sur la plaque de CCM à partir de la solution diluée (2 ml de l'extrait obtenu dissout dans 10 ml de méthanol (CH_3OH)).

Comme pour les flavonoïdes, les rapports frontaux (R_F) ont été calculés après révélation des taches sous UV et par le chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2 % [22].

3.8/Activité antibactérienne

Ce test est réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie a la Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques, Département Biologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

L'activité antibactérienne de notre extrait aqueux (dont l'eau a été choisie comme solvant par ce qu'il ne possède pas une activité antibactérienne) qui a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé [52].

3.8.1/Souches bactériennes utilisées

Sept souches bactériennes ont été utilisé ; ses souches issues des prélèvements (pus) de malades : Escherichia coli, Pseudomonas aerruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus, Escherichia coli ATCC, Staphylococcus aureus ATCC, KB (Bacille de Koch).

3.8.2/Milieus de cultures utilisées

Nous avons utilisé deux milieux de culture : Gélose Nutritive, Gélose Mueller Hinton.

3.8.3/Méthode de diffusion en milieu gélosé

3.8.3.1/Préparation de l'inoculum bactérien

Les souches bactériennes ont été revivifiées dans une gélose nutritive à 37 °C pendant 24 heures .Nous avons effectué des dilutions de la suspension dans l'eau physiologique stérile afin de standardiser l'inoculum, Ce dernier doit être dilué de telle façon que sa densité optique mesurée à 625 nm soit comprise entre 0.08-0.1. Cette densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Puis des gouttelettes de suspension bactérienne sontensemencées en strie dans les boites de Pétri préalablement coulées de gélose Muller Hinton.

3.8.3.2/Protocole expérimental

Des disques de papier wattman imbibés dans l'extrait à différentes concentrations, ont été placés à la surface de gélose Muller Hinton sèche, inoculée au préalable par 200 µl de dilution de la suspension bactérienne. Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, la sensibilité a été évaluée en mesurant le diamètre d'inhibition [52].

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait aux tours des disques.



Chapitre IV :
Résultats et discussion

1 /Résultats

1.1 /Taux d'humidité de la plante

TH =77.7%

Le taux d'humidité évalué pour les feuilles de Marrubium vulgare est de **77.77%**. Ceci signifie que plus de la moitié du poids de la plante que nous avons utilisé est constituée d'eau. Le résultat est représenté sur la (Fig.16).

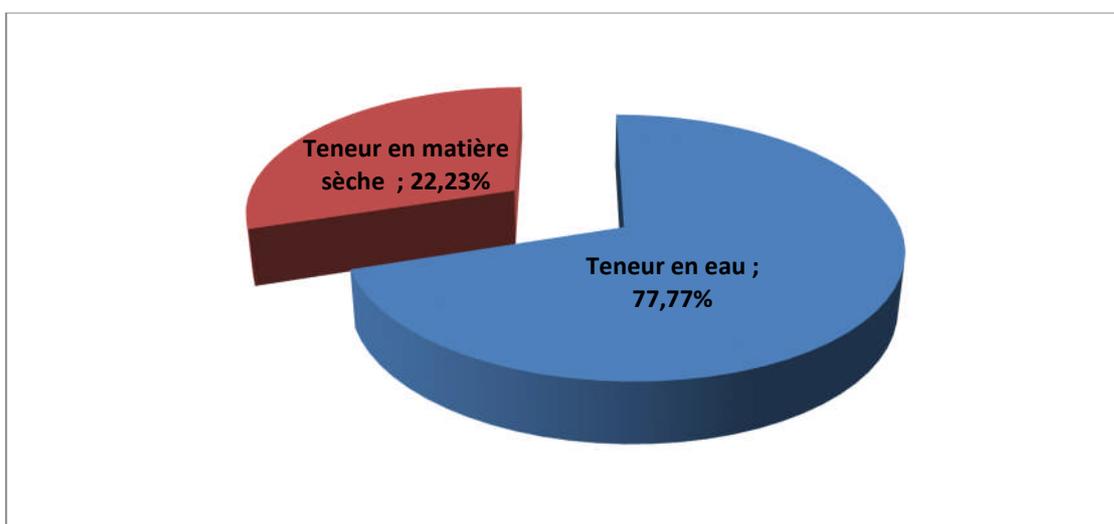


Fig.14 : Teneur en eau et en matière sèche du Marrubium vulgare.

1.2 /Rendement

Le rendement des extraits étudiés (aqueux, méthanolique, éthanolique) a été déterminé par rapport à 5 g du matériel végétal sec (feuilles). Les résultats obtenus sont représentés dans le **Tableau N°3**.

Tableau N° 3: Rendements des extraits bruts des feuilles de Marrubium vulgare.

Extrait brut	Poids de l'extrait (g)	Rendement de l'extrait (%)
Extrait aqueux	0.944	18.88
Extrait méthanolique	0.808	16.16
Extrait éthanolique	0.761	15.22

Les taux de polyphénols totaux enregistrés dans les extraits éthanolique, méthanolique et aqueux, de l'espèce *Marrubium vulgare* étudiée sont résumés dans la (Fig.15).

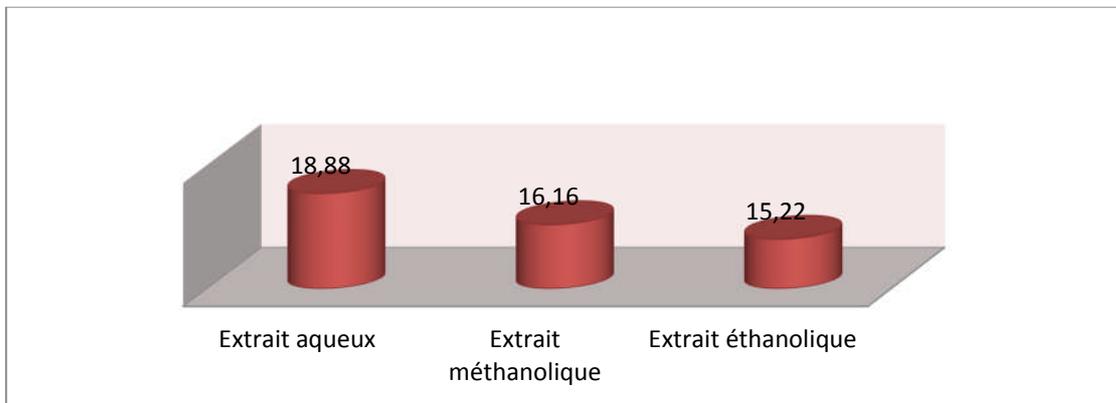


Fig.15 : Rendement d'extraction.

D'après ces résultats on constate clairement que le taux de polyphénols estimés varie proportionnellement en fonction de la polarité des solvants d'extraction. En effet, l'extrait aqueux a présenté le taux le plus élevé avec une valeur de 18.88% suivie par l'extrait méthanolique 16.16%. Alors que la teneur la plus faible est enregistrée pour l'extrait éthanoliques avec une valeur de 15.22%. En accord avec ces résultats, plusieurs travaux affirment que les polyphénols sont plus solubles dans les solvants polaires que dans ceux apolaires [22].

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant. En plus de ces aspects quantitatifs, quelque soit la méthode d'extraction appliquée, elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bioactivité de ses principes actifs [22].

Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bioactivité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction [22].

1.3/Résultats de screening phytochimique

Les tests phytochimiques sont réalisés sur les extraits de la partie aérienne [22, 23] de *Marrubium vulgare*, préparés dans différents solvants (eau, méthanol et éthanol) par le mode de préparation (macération) par des techniques de caractérisation qualitatives. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau N° 4**.

Tableau N° 4 : Résultats de screening phytochimique.

Les tests phytochimiques		Partie aérienne <i>Marrubium vulgare</i>		
Métabolites secondaires	Réactifs	Extrait aqueux	Extrait méthanolique	Extrait éthanolique
Flavonoïdes	Mg ⁺⁺	+++	++	+
Tanins	FeCl ₃	+++	++	+
Stérols et triterpènes	Réaction de lieberman et Burchardt	-	-	-
Stéroïdes	Anhydride acétique + H ₂ SO ₄	+	+	+
Amidon	NaCl	-	-	-
Saponosides	Test de mousse	+	+	+
Anthocyanes	H ₂ SO ₄ + NH ₄ OH	-	-	-
Glycosides cardiaques	Chloroforme + H ₂ SO ₄	-	-	-
Terpenoïdes	Test de Slakowski	+	+	+
Alcaloïdes	Mayer	-	-	-
	Wagner	-	-	-

Les résultats obtenus ont été évalués comme suit : +++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement Positif ; - : Négatif.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaire au niveau des feuilles de la plante étudiée (*Marrubium vulgare*). La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation ou un changement de couleur.

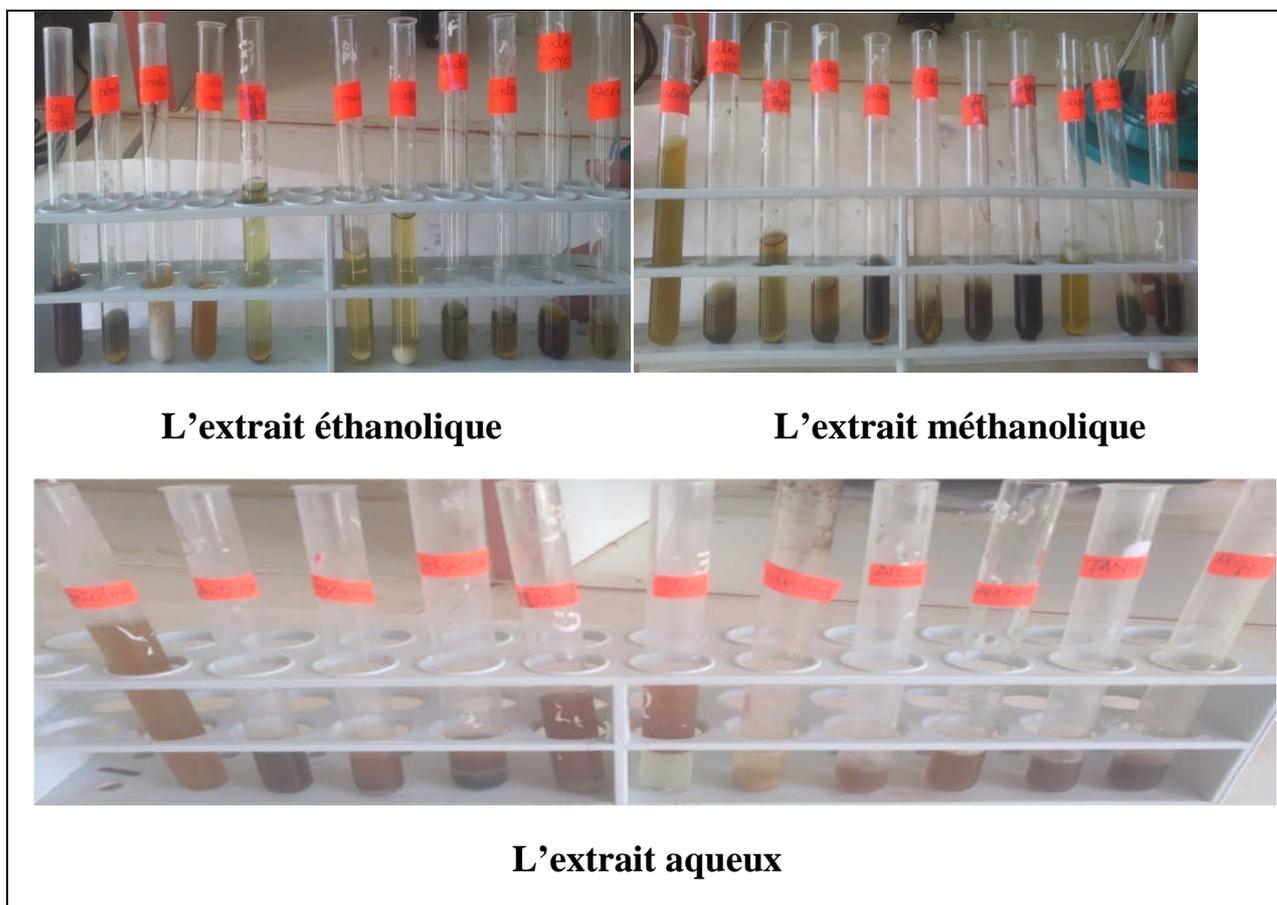


Fig.16 : Résultats du screening phytochimique

Les résultats obtenus des tests phytochimiques, des différentes préparations de la partie aérienne du *M. vulgare* (**Fig.16**), ont révélé la richesse de cette plante en tanins, flavonoïdes, terpénoïdes, stéroïdes et saponines dans les différentes préparations aqueuses, éthanolique et méthanolique.

Par contre, les tests des alcaloïdes, d'amidon, des glycosides cardiaques et des anthocyanes sont marqués négatifs dans les différents extraits.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature par les travaux de Djahra, 2010 et Ashkennazy, 1983 [22, 23].

1. 4/Résultats de dosage quantitatif

1.4.1/Dosage des polyphénols

Les teneurs en composés phénoliques obtenus à partir des extraits bruts méthanolique, éthanoliques, et aqueux ont été estimées grâce à une courbe d'étalonnage. Le dosage a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée avec le réactif de Folin-Ciocalteu, réalisée avec un extrait de référence, l'acide gallique à différentes concentrations [22].

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent en acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage $y=0.007x+0.070$ établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,996$ (Fig.17).

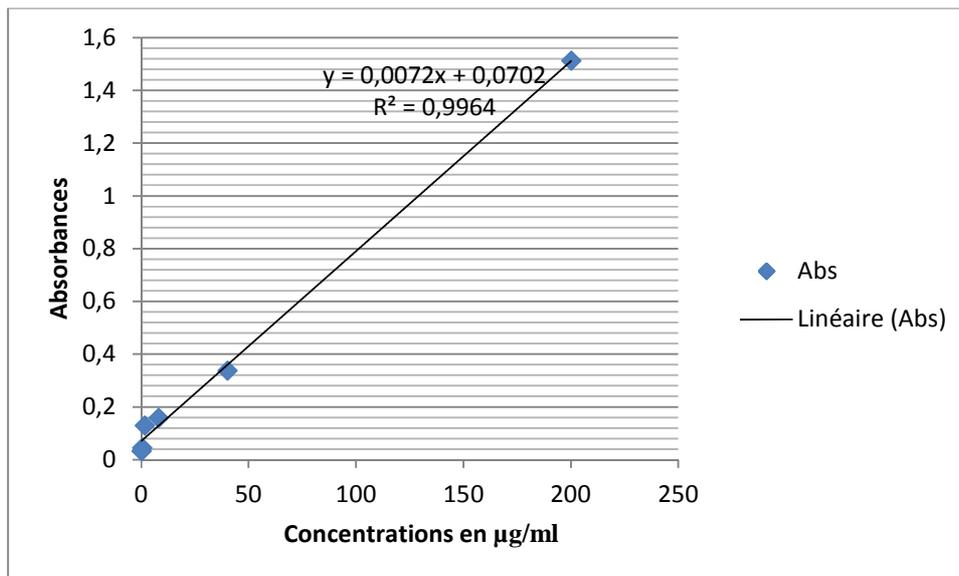


Fig. 17: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

Les teneurs en composés phénoliques totaux des différents extraits des feuilles de Marrubium vulgare sont enregistrées dans le **tableau № 5**.

Tableau N° 5: Teneur en composés phénoliques totaux des extraits bruts méthanolique, éthanolique, et aqueux des feuilles de Marrubium vulgare L.

	Absorbance	Teneur en composés phénoliques (mg EAG/g d'extrait)
Extrait aqueux	0.311	8.69
Extrait méthanolique	0.171	3.24
Extrait éthanolique	0.081	2.26

1.5/Analyse des polyphénols totaux par la chromatographie sur couche mince (CCM).

L'analyse par chromatographie sur couche mince des trois extraits (aqueux, méthanolique, éthanolique) sont effectuées sous une lampe à UV. La phase mobile qui est constituée de dichlorométhane, a permis d'avoir une très bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des taches. Les taches et les fluorescences observées nous informent, après révélation des chromatogrammes avec $KMnO_4$ sur la présence des polyphénols totaux [22].

Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau N° 6**.

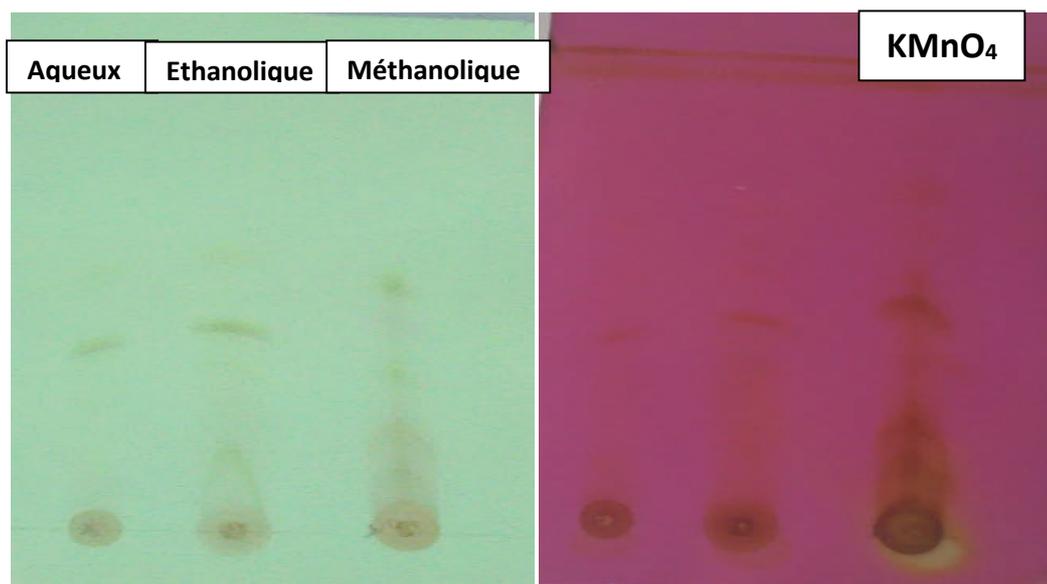


Fig.18 : Résultats de la CCM des polyphénols totaux.

Tableau N° 6 : Rapports frontaux et couleurs des taches avant et après ajout du permanganate de potassium.

	Taches	Rapports frontaux (R _f)	Couleur	
			Avant ajout de KMnO ₄	Après ajout de KMnO ₄
Extrait aqueux	Tache 1	0.34	Verte	Brune
Extrait éthanolique	Tache 1	0.44	Jaune	Brune
	Tache 2	0.66	Jaune verte	Brune
Extrait méthanolique	Tache1	0.24	Verte	Brune
	Tache2	0.46	Jaune	Brune
	Tache3	0.70	Jaune verte	Brune

L'analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) des extraits aqueux, éthanolique et méthanolique a donné de différentes taches. L'extrait aqueux possède une seule tache de couleur verte à un rapport frontal de **0.34** et que l'extrait éthanolique a décelé deux taches de couleur jaune, jaune verte ayant les rapports frontaux **0.44 ; 0.66** et pour l'extrait méthanolique on a observé trois taches de couleur verte, jaune et jaune verte de rapports frontaux **0.24 ; 0.46** et **0.70**.

L'action du permanganate de potassium (KMnO₄) sur les taches obtenues a révélé une couleur brune, Cette couleur indique la présence de polyphénols totaux [22].

1.6 /Teneur en flavonoïdes

Le rendement des flavonoïdes dans la fraction d'acétate d'éthyle eau niveau des feuilles correspond à un pourcentage égal à **1.7 %** et dans la fraction butanolique à **5.19 %** (Fig.19).

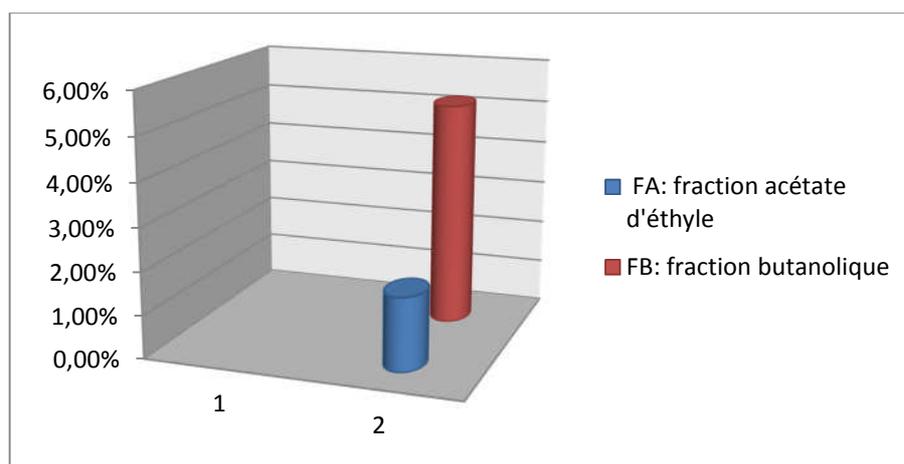


Fig.19 : Rendement en flavonoïdes des feuilles de Marrubium vulgare.

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus hétérogène des composés phénoliques répartis dans différentes classes, L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés contenus dans les feuilles par leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction et donc permet de séparer ses flavonoïdes selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et triglycosylés) [23].

Les résultats, chez le Marrubium vulgare, indiquent que la teneur la plus élevée est dans la fraction butanolique que dans la fraction d'acétate d'éthyle; d'où on conclue que le butanol est le solvant le plus adapté à l'extraction des flavonoïdes, ces résultats sont en rapport avec ceux obtenus dans l'étude du Marrubium vulgare de la région d'El Taref [22].

1.7/Teneur en tanins :

Le rendement des tanins au niveau de la drogue des feuilles est exprimé en pourcentage. Le chiffre calculé semble élevé, il est de l'ordre 9.12 %. L'espèce de Marrubium vulgare étudiée renferme en plus des flavonoïdes, des quantités assez importantes en tanins.

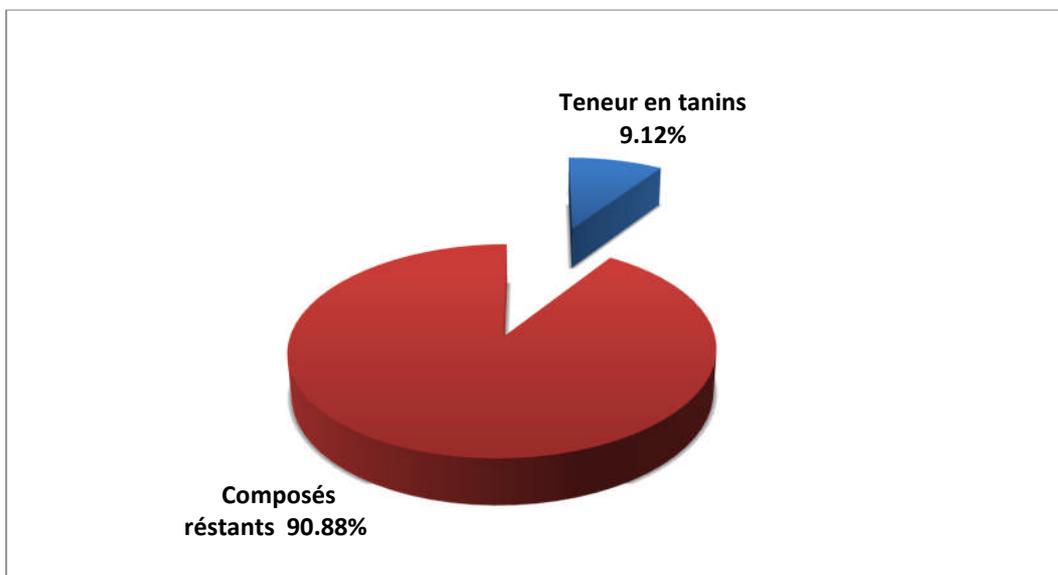


Fig.20: Rendement en tanins des feuilles de Marrubium Vulgare

1.8/Chromatographie sur couche mince des flavonoïdes :

L'analyse par chromatographie sur couche mince et l'observation des chromatogrammes de l'extrait flavonoïque sont effectuées sous une lampe à UV. Le système de migration constitué d'Acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau (5V/2V/1V), a permis d'avoir une visibilité acceptable des taches. Les taches et les fluorescences observées nous informent, après révélation avec AlCl_3 , sur la présence des flavonoïdes [22]. Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau N° 7**.

Tableau N° 7: Rapports frontaux et couleur des taches avant et après ajout du chlorure d'aluminium AlCl_3 pour les flavonoïdes.

	Tache	Rapports frontaux (R_f)	Couleur	
			Avant ajout d' AlCl_3	Après ajout d' AlCl_3
Acétate d'éthyle	Tache 1	0.59	Brune	Jaune
	Tache 2	0.66	Brune	Ocre
	Tache 3	0.94	Brune	Jaune
Butanol	Tache 1	0.29	Brune	Jaune
	Tache 2	0.69	Brune	Jaune
	Tache 3	0.89	Brune	Jaune

L'analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) de l'extrait d'acétate d'éthyle a décelé trois taches de couleur brune ayant pour les rapports frontaux **0.59** ; **0.66** et **0.94**, et que l'extrait butanolique a décelé aussi trois taches de la même couleur ayant les rapports frontaux **0.29** ; **0.69** et **0.89**.

L'action du chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) sur les taches obtenues a révélé deux couleurs différentes (jaune et ocre), ces colorations sont due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones des flavonoïdes. Ces résultats affirment l'existence des flavonoïdes dans les phases exprimant des taches jaunes et ocre [22].

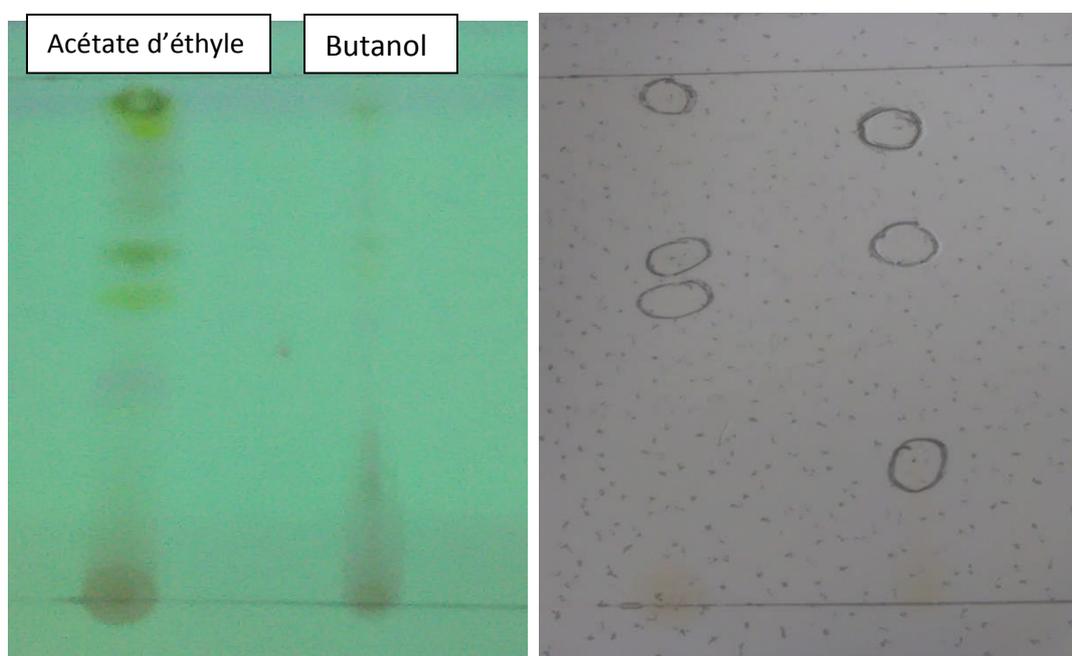


Fig.21 : Résultats de la CCM pour les flavonoïdes

1.9/Chromatographie sur couche mince des tanins :

Les taches obtenues sont au nombre de trois avec des rapports frontaux **0,26** ; **0,61** et **0,94**, toutes de couleur brune (**Tableau N° 8**).

Tableau N° 8 : Rapports frontaux et couleur des taches avant et après ajout du chlorure d'aluminium $AlCl_3$ pour les tanins.

Taches	Rapports frontaux (R_f)	Couleur	
		Avant ajout d' $AlCl_3$	Après ajout d' $AlCl_3$
Tache 1	0.26	Brune	Jaune pâle
Tache 2	0.61	Brune	Verte
Tache 3	0.94	Brune	Verte

L'ajout du réactif de chlorure d'Aluminium $AlCl_3$ a provoqué une modification de la couleur des taches (**Fig. 22**). Les couleurs ont viré du brun au jaune pâle et vert. Ces différentes couleurs obtenues confirment la nature des molécules tanniques.

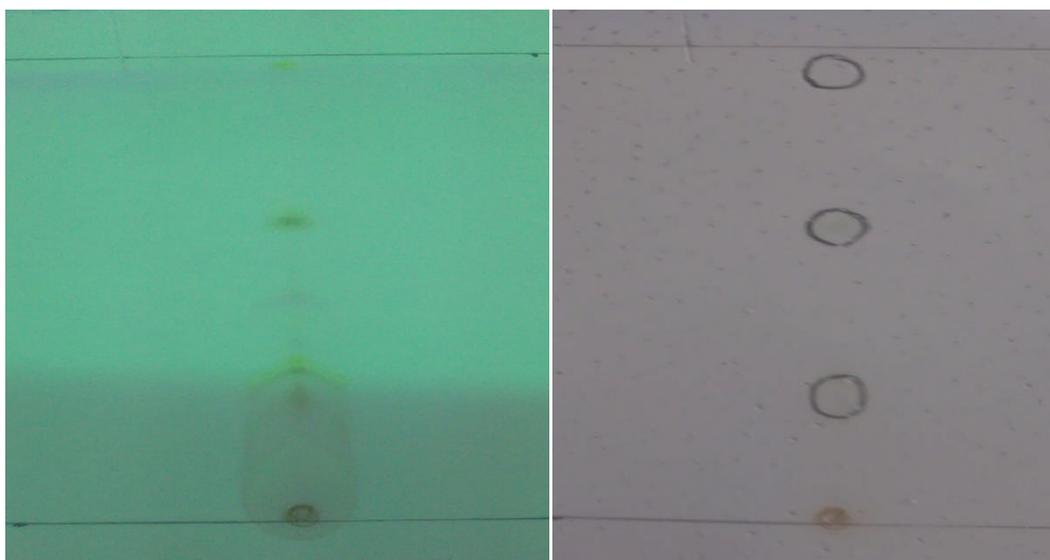


Fig.22 : Résultats de la CCM pour les tanins

1.10/Résultats des tests microbiologiques

➤ Pouvoir antimicrobien des extraits

Beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antibactérien des produits naturels extraits des plantes. Lors de cette étude, nous avons testé l'action de l'extrait aqueux des feuilles de l'espèce *Marrubium Vulgare* vis-à-vis de quelques souches bactériennes.

L'échelle d'estimation de l'activité antibactérienne a classé le diamètre des zones d'inhibition **D** de la croissance bactérienne comme suit [53] :

- Non sensible(-) : $D \leq 8$ mm
- Sensible (+) : $9 \leq D \leq 14$ mm
- Très sensible (++) : $15 \leq D \leq 19$ mm
- Extrêmement sensible (+++) : $D \geq 20$ mm

➤ Pouvoir antibactérien des extraits

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition observées autour des disques imprégnés dans l'extrait aqueux à différentes concentrations, ont été mesurées. (Fig. 23).

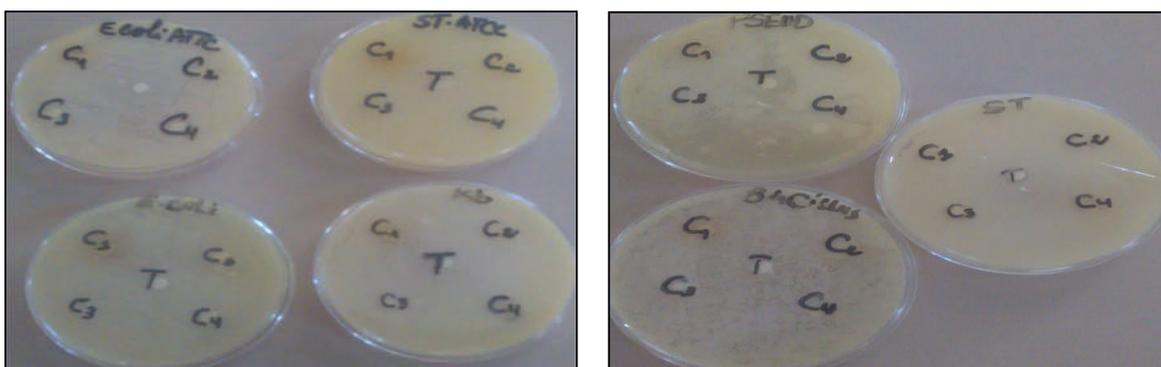


Fig. 23: Zones d'inhibition de l'extrait aqueux des feuilles de Marrubium Vulgare à différentes concentrations.

Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau N° 9**

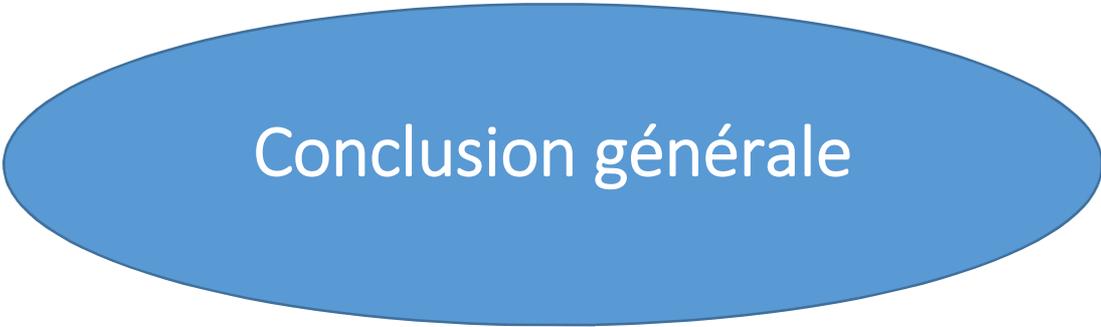
Tableau N° 9 : Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait aqueux de Marrubium Vulgare vis à vis de quelques souches bactériennes.

Souches bactérienne testées	D (mm)			
	Différents concentrations de l'extrait aqueux (mg/ml)			
	C ₁ = 56.2	C ₂ = 11.2	C ₃ = 2.2	C ₄ = 0.44
Escherichia Coli	10	8.8	6	0
Escherichia Coli ATCC	9.1	0	0	0
STaphylococcus aureus	0	0	0	0
ST ATCC	6	2	0	0
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	0
KB	8	0	0	0
Bacillus	0	0	0	0

Les résultats obtenus montrent que pour une concentration C₁ (56.2 mg/ml), l'extrait aqueux de Marrubium Vulgare présente une faible activité sur Escherichia Coli et Escherichia Coli ATCC et aucune activité contre Staphylococcus ATCC, Bacille de Koch (KB), Pseudomonas aeruginosa ,Bacillus et ST aphylococcus aureus.

Ceci nous ramène à conclure que l'activité antibactérienne dépend de la concentration de l'extrait ainsi que du type des bactéries ciblées [54].

Certains auteurs avancent que plusieurs paramètres peuvent influencer la détermination de l'activité antibactérienne comme : le type des micro-organismes ciblés, la méthode d'évaluation de l'activité, la concentration, le type de l'extrait et particulièrement la nature et la structure moléculaire des molécules bioactives des métabolites secondaires [55].



Conclusion générale

Conclusion générale

Notre travail a porté sur l'étude phytochimique des feuilles du marrube blanc *Marrubium vulgare*, récoltée dans la région de Draa Ben Khedda, wilaya de TiziOuzou.

L'étude phytochimique des feuilles du Marrube blanc (*Marrubium vulgare*) a permis d'obtenir un rendement d'extraction avec des solvants de polarité différente (eau, méthanol, éthanol) de l'ordre de **18.88%** ; **16.16%** et **15.22%** respectivement. En accord avec ces résultats, plusieurs travaux affirment que les polyphénols sont plus solubles dans les solvants polaires que dans ceux apolaires.

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur les différents extraits (aqueux, éthanolique et méthanolique) ont prouvé la richesse des feuilles du *M. vulgare* en tanins, flavonoïdes, terpénoïdes, stéroïdes et saponines.

Le dosage des polyphénols totaux de l'espèce *Marrubium vulgare* par le réactif de FolinCiocalteu a révélé que l'extrait aqueux contient la plus grande teneur de l'ordre de 8.69 (mg EAG/g d'extrait).

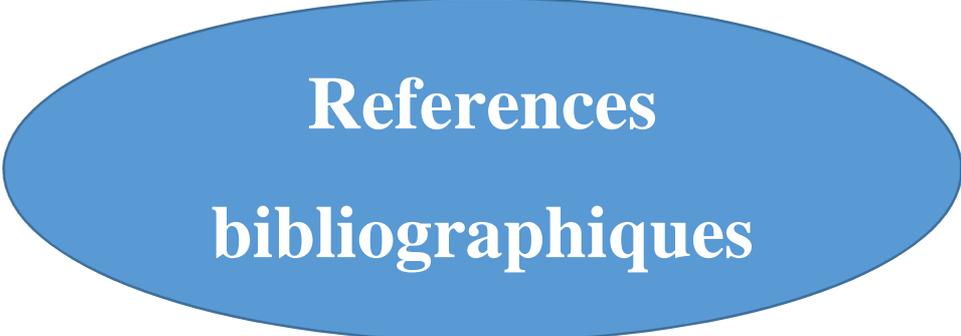
L'extraction des flavonoïdes et des tanins nous amène à dire que les feuilles de l'espèce *Marrubium vulgare* étudiée renferment en plus des flavonoïdes, des quantités assez importantes de tanins de l'ordre de 9.12 %.

La présence de ces composés a été confirmée par la méthode de Chromatographie sur Couche Mince (CCM) réalisée sur les différents extraits.

L'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium Vulgare* vis à vis de différentes souches bactériennes, a montré que ce dernier présente une faible activité contre *Escherichia Coli* et *Escherichia Coli* ATCC et ceci pour une concentration, de 56.2 mg/ ml. En outre, aucune activité vis à vis de *Staphylococcus aureus* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus*, *ST* *aphylococcus aureus* et *Bacille de Koch* n'a été observée.

On conclut que le marrube blanc est la source de certaines matières premières pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique, on verra de ces métabolites identifier utilisés pour traiter plusieurs maladies.

Cette étude n'est qu'une ébauche d'un travail qu'il faut poursuivre, étendre et approfondir afin de connaître tous les bienfaits que cette plante peut nous apporter. Et d'étudier son activité anti-oxydante et anti-inflammatoire ; et refaire l'activité antibactérienne pour les extraits à concentration plus élevées et aussi pour les extraits des flavonoïdes et des tanins.



References
bibliographiques

Références bibliographiques

- [1]: A.Gurib-Fakim, Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular aspects of medicine, P: 1-27-93, 2006.
- [2]: O.Benaissa, Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité biologique. Thèse Doctorat, Université Mentouri Constantine, P : 63, 2011.
- [3] : J.Bruneton, Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Ed Tec & Doc, Paris, P: 101-120,1999.
- [4] : J.M.Jeaun., F.Annie., J.L .Chrystian, Les composés phénoliques des végétaux. Ed : Masson, P : 203- 204, 2005.
- [5] : M.Ali.Youssef, Plantes médicinales de Kabylie. Ed : Ibis press (Paris), P : 349,2006.
- [6] : L.Bézanger-Beauquesne., M.Pinkas., M. Torck ,Les plantes dans la thérapeutique moderne. 2ème édition révisée, Ed : Maloine, 1986.
- [7] : R.E.Spichiger., V.V.S.Murielifigeat., D.Jean movode, Botanique et systématique nouvelles des angiospermes des régions tempérés et tropicales. Ed : Press Polytechnique et Université ramande, P : 413, 2004.
- [8]: J.L.Guignard., F.Dupond, Botanique et systématique moléculaire. Ed : Masson, P:284, 2004.
- [9] : Botanique des plantes .Rapport sur les plantes de la famille des lamiacées. 2015. <http://www.via-les-herbes.com/les-lamiacee>. Consulter le 5/05/2016.
- [10]: S.C.Meyre., R.A.Yunes., V.Schlemper., F.Campos-Buzzi., V.Cechinel-Filho, Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). *II Farmaco*.60, P: 321–326, 2005.
- [11]: P.Quezel., S.Santa, La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed : CNRS (Paris),P:360-361, 1963.
- [12]: JanVolak ., Jiri Stodola, Les plantes médicinales. Ed : Gründ, P : 29-32,1983.

- [13] : J.C.Houdret, Bien se soigner par les plantes.1^{ère}Ed.P: 297, 2004.
- [14] : M.Rombi., R.Dominique , 120 plantes médicinales : composition, mode d'action et intérêt thérapeutique. Ed : Alpen, P : 527, 2007.
- [15] : T.Cecchini ., B.Ticli,Les plantes médicinales. Ed : De Vecchi, P : 192-193, 2008.
- [16] : P.F.Schauenberg,Guide des plantes médicinales. P: 382, 2004.
- [17] : G.Debuigne., F.Couplain , Petit Larousse des plantes médicinales. Ed : Larousse, P : 383, 2009.
- [18] : J.Belakhdar, La pharmacopée traditionnelle. Ed : Tec et Doc, P: 784, 1997.
- [19]: R.Belhattab., L.Larous , Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria,J Essent Oil Res 18, 369–73,2006
- [20]: A.Pukalskas.,PR.Venskutonis., S.Salido ., et al , Isolation,identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania, Food Chem130, 695–701, 2012
- [21]: B.Ahmed., MH.Masoodi., AH.Siddique., S.Khan , A new monoterpene acid from *Marrubium vulgare* with potential antihepatotoxic activity. Nat Prod Res24, 1671–80, 2008
- [22] : Djahra.Ali.Boutelis, Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L, thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, 2013.
- [23]: D.Ashkenazy.,J.Friedman., Y.Kashman , The furocoumarin composition of *Pituranthos triradiatus*, Journal of Medicinal Plant Research47, 218-220, 1983
- [24]: T.W.Graham-Solomons, Fundamentals organic chemistry in United States of America, 915, 1994.
- [25] : M.Kansole, Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire pour obtenir unDiplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso, 2009.

- [26]: F.Epifano., S.Genovese., L.Menghini., M.Curini , Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*68, 939-953, 2007.
- [27]: Hopkins, *Physiologie végétale*. 2^{ème} édition Boeck, P: 276-280, 2003.
- [28]: J.Bruneton, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Technique et documentation Lavoisier (Paris), P: 915, 1993.
- [29]: B.H.Havsteen, *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. *Pharmacol. Therapeut.* 96,67– 202, 2002.
- [30]: G.P.Ribereau, *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod (Paris), P : 254,1968.
- [31]: J.L.Pousset, *Plantes médicinales africaines*. Edition Ellipses, 1989.
- [32]: A.Ghestem., E.Seguin., M.Paris., A.M.Orecchioni, *Le préparateur en pharmacie*. Dossier 2, *Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie-homeopathie*. Ed : Tec et Doc., P : 272, 2001.
- [33]: S.Krief, *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal*, thèse de Doctorat, muséum national d'histoire naturelle. P : 32, 2003.
- [34]: T.Cyril, *étude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de Catharanthus Roseusen, vue du développement d'un modèle cinétique*, université de Montréal. P : 28, 2001.
- [35]: M.Malecky, *Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins*. Thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro (Paris) Tech. P: 9; 13; 19; 20; 27, 2005.
- [36]: D.Loomis., R.Croteau, *Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise*. In: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds). *The Biochemistry of Plants. Lipids: Structure and Function* No. 4. Academic Press, San Francisco. P : 364-410, 1980.
- [37]: Alilou Hakim, *Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du sud du Maroc : Asteriscus graveolens subsp.odorus (Schousb.) Greuter et Asteriscus imbricatus(Cav.)DC*. thèse de doctorat .université Iben Zohr (Agadir Maroc), P :42, 2012.

- [38] : G.Figuero, Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal, P: 13, 2007.
- [39] : A.Domart., J.Bourneuf, Nouveau Larousse des plantes médicinales. Librairie Larousse (Paris). 1988.
- [40] : S.B.Kahumba., T.Kahambwe., T.Mbayo., M.Kalonda., M.Mwamba., O.Penge, Contribution à l'étude de quelques plantes médicinales anti diarrhéiques en usage dans la ville de Lubumbashi et ses environs, Annales de Pharmacie 3, 75-86, 2005
- [41] : B.Lendvai., T.Zelles., B.Rozsa., E.S.Vizi, Vinca alkaloid exchanges morphological dynamics of dentric neocortical Layer 2/3 pyramidal cells. Brain Research Bulletin 59, 257-260, 2002.
- [42] : J.Bruneton, Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} ed, revue et augmentée (Paris), Tec & Doc - Éditions médicales internationales, P:128, 2009.
- [43] : J.B.Harborne, Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition, ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB), 203-214, 1998.
- [44] : K.Benzahi, Contribution à l'étude des flavonoides dans la Plante cynodon Dactylon-L (chindent). Mémoire de Magister, Université de Ouargla, P : 15-17, 2001.
- [45] : Chaouch, Etude des alcaloides dans le coloquinte *Colocynthis vulgaris* (L) Schrad (cucurbitacées) Région de Oued N'sa (Wilaya de ourgla). Mémoire de magister, Université de Ouargla, P : 44, 2001.
- [46] : J.B.Harbarne, Phytochemical methods, Chapman and Hall, LTD (London), P: 49-188, 1973.
- [47] : D.Dialla, Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Azoaceae), *Diospyros abyssinica* (Eblanceae), entada Africana (Meliaceae), these de Doctorat, unive, Lausanne Suisse, 2000.

[48]: V.L.Singleton., R.Orthofer R., R.M.Lamuella-Raventós , Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178, 1999.

[49]: J.G.Wong ., R.A.Anderson ., G.M.Graham ., M.C.Chu ., M.V.Sauer ., M.M.Guarnaccia ., R.A.Lobo , The effect of cinnamon extract on insulin resistance parameters in polycystic ovary syndrome: a pilot study. *FertilSteril* 88 (1), 204-3, 2007.

[50] : M.Wichtl ., R.Anton R, *Plantes thérapeutiques*. 2^{ème} edition (paris), P: 692, 2003.

[51]: S.Sowunmi ., R.O.Ebewele ., C.A.H.Peters , Differential scanning calorimetry of hydrolysed mangrove tannin. *Polymer International* 49, 574-578, 2000.

[52]: D.Lesueur ., D. Serra de Rocca ., A.Bighelli ., T.M.Hoi ., N.K.Ban ., T.H.Thai ., J.Casanova , Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Michelia faveola*, Meryllax Dandy from Vietnam . *Flavour and Fragrance Journal* 22, 317-321, 2007.

[53]: M.R.Moreira., M.R.Ponce., A.G.Del Valle., C.E.Roura, S.I Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Leaving Water Temperature* 38, 565-570, 2005.

[54]: O.Gortzi., S.Lalas., I.Chinou., J.Tsaknis, Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Origanum dictamnus* Extracts before and after Encapsulation in Liposomes. *Molecules* 2, 932-945, 2007.

[55]: Cushnie TPT, Lamb AJ Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 38, 99-107, 2011.

Glossaire

Lexique des termes botaniques

Akène : Fruit sec ne comportant qu'une seule graine et qui, parvenu à maturité, ne s'ouvre pas spontanément ; on parle de diakène, quand le fruit contient deux graines, de tétrakène quand il contient quatre. Fruit sec indéhiscent contenant une graine libre. .

Androcée : Est l'appareil reproducteur mâle de la fleur, c'est-à-dire l'ensemble des étamines.

Aromathérapie : Thérapeutique par ingestion, massage du corps ou inhalation d'huiles essentielles végétales ou d'essences aromatiques. (L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie, traitement des maladies par des produits dérivés des plantes).

Bractée : Est une pièce florale en forme de feuille faisant partie de l'inflorescence. L'ensemble des bractées s'appelle involucre.

Calice : Verticille externe ou unique de la fleur, formé de pièces le plus souvent vertes (sépales) et assurant la protection des autres verticilles dans le bouton floral.

Cotonneuses : Recouvert de duvet : Une pêche à la peau cotonneuse.

Crochu : Recourbé en forme de crochet : Bec crochu.

Corolle : Ensemble des pétales d'une fleur.

Diterpène labdane furanique : Sont des substances d'origine organique en C₂₀ (20 atomes de carbone) de la famille des terpènes. Ils sont constitués de quatre unités d'isoprène.

Duveteux : Qui a beaucoup de duvet . Poils fins et très courts, d'apparence cotonneuse, qui poussent sur certains végétaux.

Ecorces : L'écorce est le revêtement extérieur du tronc, des branches et des racines des arbres, et plus généralement des plantes ligneuses.

Espèce nitrophile : Se dit d'une plante qui pousse sur les sols les plus riches en nitrates.

Étamine : Organe male de la fleur produisant le pollen, composé d'une partie allongée le filet et d'une partie supérieur renflé (l'anthère).

Feuillue : Qui a beaucoup de feuilles.

Feutré : Garni de feutre, peu bruyant.

Glomérules : Inflorescence contractée, ayant la structure d'une cyme mais dont les axes sont très courts.

Herbacé : Végétal qui a la texture d'une herbe.

Latex : Le latex est une substance liquide, à consistance plus ou moins épaisse, produite par certaines plantes ou par certains champignons (dont les lactaires).

Ligneuse : Se dit d'une plante contenant suffisamment de faisceaux lignifiés pour que ses tiges soient résistantes.

Limbe : Partie principale, élargie et étalée, généralement riche en chlorophylle, de la feuille.

Mellifère : Se dit d'une plante dont le nectar est récolté par les abeilles pour élaborer le miel.

Pétiolées : Se dit des feuilles qui sont portées sur un pétiole.

Phytothérapie : Traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes.

Plantes vasculaires : Sont pourvues de vaisseaux par lesquels circule l'eau puisée par les racines. Cette circulation de l'eau, combinée à la structure de la paroi cellulaire, permettent aux plantes vasculaires d'atteindre de grandes dimensions.

Poils glanduleux : Poils terminés par une petite glande, comme dans la pulpe des oranges et des citrons.

Rhizome : Tige souterraine vivace, généralement à peu près horizontale, émettant chaque année des racines et des tiges aériennes.

Robuste : Se dit des végétaux qui supportent les conditions rigoureuses du climat ou du milieu.

Tomenteuse : Qui a l'aspect du duvet.

Vacuole : La vacuole est un organite présent dans la cellule végétale. Les pollens, les cellules fongiques. De rares auteurs parlent de vacuoles dans les cellules animales mais le terme de vésicule est plus approprié.

Végétaux supérieurs : Végétaux d'une organisation complexe, généralement pourvus de racines, tiges, feuilles et contenant de la chlorophylle.

Vivace : Se dit d'une plante dont la période de végétation s'étend sur plusieurs années.

Lexique des termes médicaux

Anti carcinogène : Un carcinogène est un agent capable de provoquer le cancer

Anti-agrégation plaquettaire : Un antiagrégant plaquettaire, ou antiagrégant, est un médicament qui diminue l'agrégation plaquettaire et inhibe la formation du thrombus

Antifongique : Médicament utilisé dans le traitement des mycoses (infections par des champignons microscopiques).

Anti-œdémateuse : Un œdème se définit par le gonflement d'un tissu ou d'un organe secondaire à l'accumulation de liquide, essentiellement de l'eau. Il survient surtout au niveau des membres inférieurs (jambes). Les médicaments anti-oedémateux sont indiqués dans le traitement des œdèmes

Antispasmodique : Les antispasmodiques sont des médicaments qui aident à traiter les spasmes musculaires. Il s'agit de calmer ou de neutraliser des contractions involontaires des muscles.

Antitumoral : Un médicament antitumoral est un médicament qui possède des propriétés anticancéreuses.

Antivenimeuse : Substance qui combat l'effet toxique des venins (liquides injectés par piqûre ou morsure par certains animaux).

Astringente : L'astringence est une propriété de certaines substances de produire une crispation des muqueuses .Se dit d'une substance qui resserre et assèche les tissus, et peut faciliter leur cicatrisation.

Cytotoxique : La cytotoxicité est la propriété d'un agent chimique ou biologique à être toxique pour les cellules, éventuellement jusqu'à les détruire.

Diurétique : En médecine, les diurétiques sont surtout utilisés pour augmenter l'élimination du sodium et de l'eau par le rein. La propriété d'augmenter. Ils exercent cet effet par une inhibition de la réabsorption rénale du sodium.

Expectorante : Un expectorant est un médicament qui facilite l'expectoration, c'est-à-dire le rejet des produits formés dans les voies respiratoires (crachats).

Hypoglycémiant : Les hypoglycémiantes sont des produits diminuant la glycémie (concentration de sucre sanguin). Il existe des hypoglycémiantes naturels comme le nopal (plante médicinale).

Hypolipidémiant : Un hypolipidémiant est un médicament qui fait baisser le taux de graisse dans le sang, le cholestérol et les triglycérides essentiellement. Synonyme : hypolipémiante. Les triglycérides : graisses circulant dans le sang.

Immunostimulante : Se dit d'un produit ou d'un procédé qui stimule les défenses immunitaires (vaccin, par exemple).

Mutagènes : Agent susceptible de provoquer des mutations de l'ADN (étape initiale de la cancérogenèse) à condition que cette mutation porte sur des gènes impliqués dans le processus de cancérogenèse. Les agents dits cancérogènes directs sont également mutagènes.

Ophthalmie : Inflammation de l'œil.

Otite : Inflammation de l'oreille.

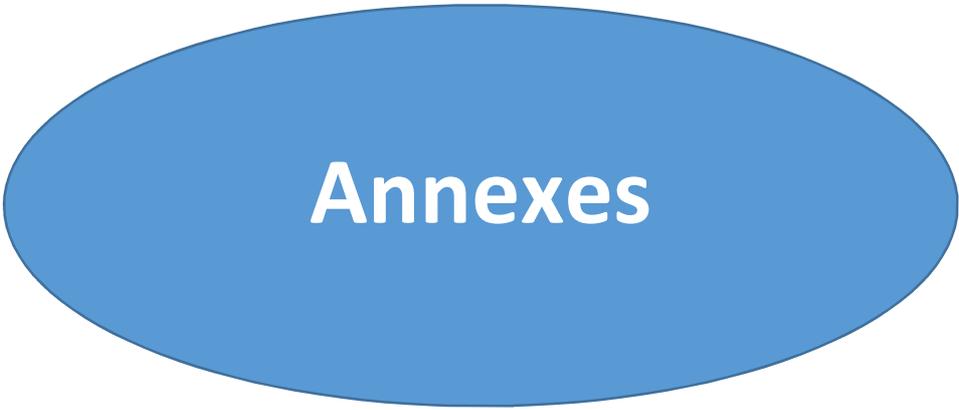
Stimulant : Un stimulant est une substance qui augmente l'activité du système nerveux sympathique facilitant ou améliorant certaines fonctions de l'organisme.

Tanner la peau : Préparer les peaux avec du tan ou diverses substances tannantes pour les rendre imputrescibles et en faire du cuir. Donner un aspect brun hâlé à la peau : Le soleil et l'air marin lui ont tanné le visage.

Tonique : Se dit d'un médicament qui reconstitue les forces vitales de l'organisme ou d'une fonction.

Vasodilatatrice : Les vasodilatateurs sont des médicaments qui permettent de dilater les vaisseaux sanguins (veines et artères), en relâchant les muscles lisses de leurs parois. Ils sont notamment indiqués en cas d'hypertension artérielle (HTA) ou d'insuffisance cardiaque.

Vasorelaxant : Diminution du tonus de la paroi musculaire des artères.



Annexes

Annexes

Annexe 1 : Réactifs de caractérisation

Réactif d'amidon : La préparation du réactif d'amidon s'effectue comme suit :

- Dissoudre 1,2 g d'iode (I_2) dans 50ml d'eau distillée contenant 2,5g d'iodure de potassium (KI)
- Chauffer pendant 5 minutes
- Diluer jusqu'à 250ml ou 500 ml.

Réactif de Wagner : Ce réactif a été préparé comme suit :

- Dissoudre 2g de KI et 1,27g I_2 dans 75ml d'eau distillée
- Ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.

Réactif de Mayer : La préparation de ce réactif s'effectue comme suit :

- Dissoudre 1,358g de $HgCl_2$ dans 60ml d'eau distillée
- Dissoudre 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions
- Ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.

Solution de $FeCl_3$ a 1% : Cette solution a été préparée comme suit :

- Dissoudre 1g de $FeCl_3$ dans 99 ml d'eau distillée.

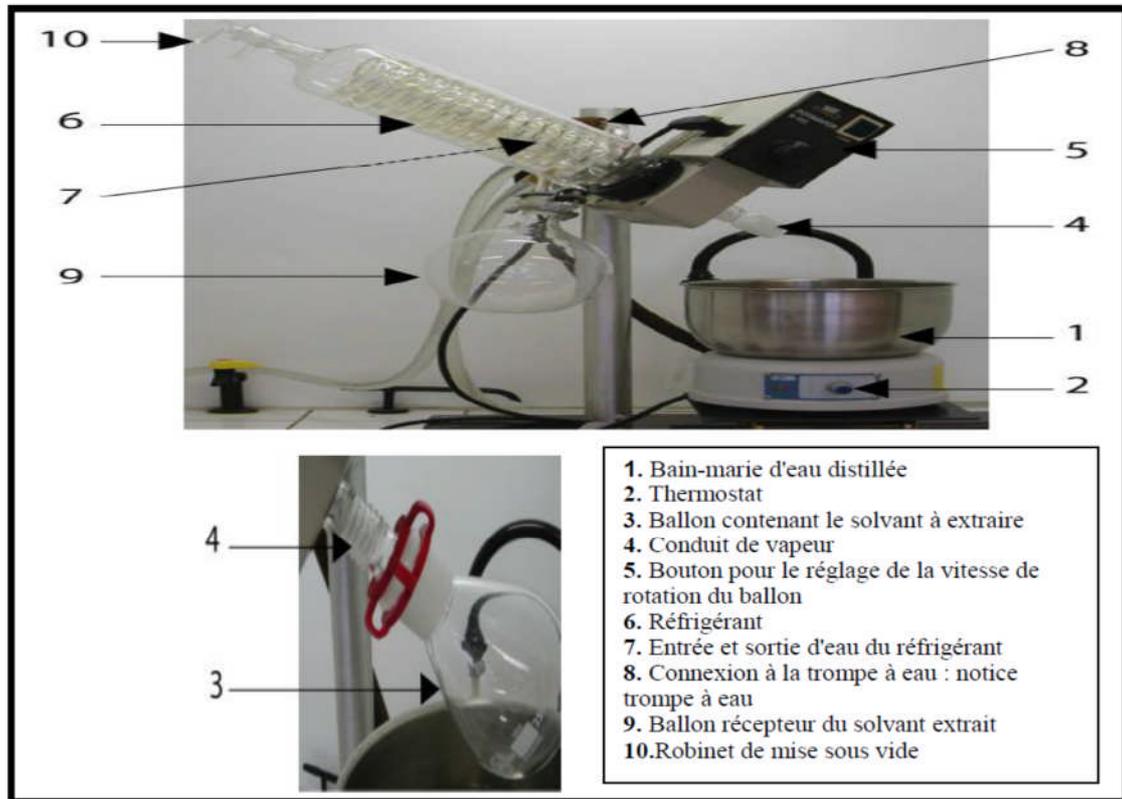
Annexe 2 :

Acide gallique (0 à 200 $\mu\text{g/ml}$)

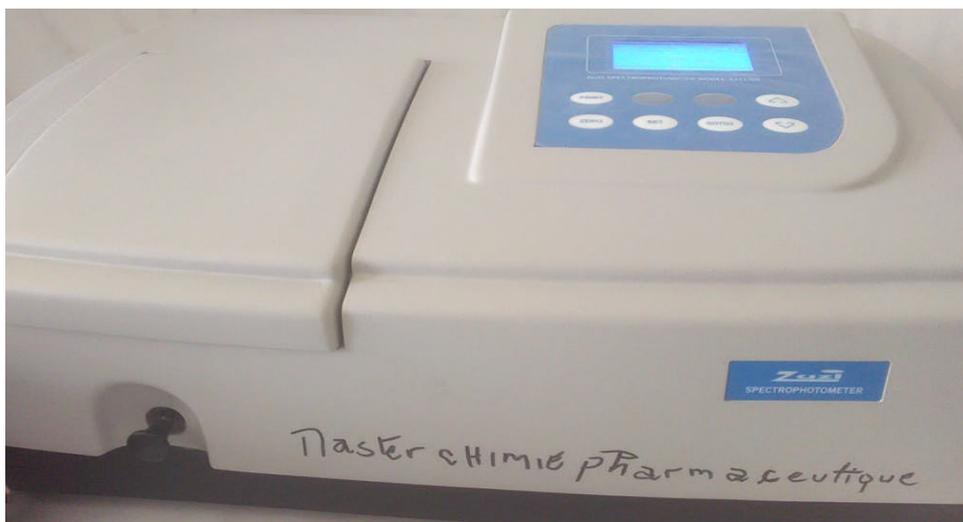
Dissoudre 200 μg d'acide gallique dans 100 ml d'eau distillée (solution mère), des solutions à différentes concentrations ont été préparées à partir de la solution mère.

[C] $\mu\text{g/ml}$	200	40	8	1.6	0.32	0.064
Absorbance à 765 nm	1.514	0.339	0.160	0.130	0.046	0.034

Annexe 3: Liste des appareils utilisés



Rota vapeur



Spectrophotomètre UV-VIS(ZUZI)

Annexe 4 :

1. Gélose nutritive : La gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (GNO) ou encore gélose ordinaire est un milieu d'isolement non-sélectif.

- **Composition :**

Extrait de viande	1.0 g
Extrait de levure	2.5 g
Peptone	5.0 g
Chlorure de Sodium	5.0 g
Agar	15.0 g
PH	7.0

- **Préparation :**

Mettre 28 g de poudre en suspension dans un litre d'eau purifiée, bien mélanger. Chauffer sous agitation et laisser bouillir pendant 1 min. Stérilisé à l'autoclave à 118°C pendant 15 min.

2.Gélose Mueller-Hinton : C'est un milieu destiné à la réalisation d'antibiogramme par diffusion.

- **Composition :**

Peptones de viande (Bovin)	2 g
Peptone de caséine (Bovin)	17.5 g
Fécule de pomme de terre (Amidon)	1.5 g
Ion Ca ⁺⁺	45 à 75 mg/l
Ion Mg ⁺⁺	20 à 35 mg/l
Agar	17 g

- **Principe :**

Sa faible teneur en thymine-thymidine (élément inhibiteur de l'activité des sulfamides) diminue les phénomènes de repousse autour des disques et permet une meilleure détermination des diamètres d'inhibitions.

- **Préparation :**

Mettre 38 g de poudre en suspension dans un litre d'eau purifiée, bien mélanger .Chauffer sous agitation et laisser bouiller pendant 1 min. Autoclaver à 118 °C pendant 15 min.

3. Eau physiologique :

Dissoudre 9 g de chlorure de sodium NaCl dans 1 litre d'eau distillée. Bien agiter. Autoclaver à 118°C pendant 24 heures.