

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



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**Etude de l'activité antibactérienne des flavonoïdes et des
tanins du marrube blanc et l'évaluation de l'activité
antioxydante de l'extrait tannique**

Présenté par : HOUAZENE MOUNIRA

ALEM OUERDIA

Soutenu publiquement, le 28 / 09 / 2017 devant le Jury composé de :

M ^{me} KICHOU Noura	MCB	UMMTO	Présidente
M ^{me} KHALDI Nassima	MAA	UMMTO	Examinatrice
M ^r BENCHOULAK Mounir	MAB	UMMTO	Examineur
M ^{me} TALBI Ouarda	MAB	UMMTO	Encadreur

Remerciements

On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination. Les cinq années de maîtrise nous a permis de bien comprendre la signification de cette phrase toute simple. En effet, ce parcours ne s'est pas réalisé sans défis et sans soulever de nombreuses questions pour lesquelles les réponses nécessitent de longues heures de travail.

A la fin de ce travail au nom d'ALLAH tout puissant à lui le plus grand merci de nous avoir donné la foi et de nous avoir permis d'en arriver là.

Nous adressons nos profonds remerciements à tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire de fin d'études et ceux qui nous ont aidé de près ou de loin.

Tout l'honneur et toutes nos reconnaissances vont à nos chers parents pour leurs encouragements leur bienveillance durant tout notre cursus.

Nos remerciements vont particulièrement à notre promotrice pour sa disponibilité et son encadrement : M^{me} TALBI OUARDA.

Nous remercions aussi les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant de juger notre travail.

Nous tenions aussi à remercier Mr HOUALI le responsable du laboratoire de recherche microbiologie qui a mis à notre disposition tous les moyens nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous remercions l'ingénieur du laboratoire de chimie pharmaceutique M^{me}Rabiaa.

Et enfin nous tenons à remercier infiniment tous les enseignants de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chères :
A mes très chères parents source de tendresse et d'amour qui
m'ont tout donné et pour les sacrifices qu'ils ont consenti
pour mon instruction, que dieu les gardes et les entoure de
sa bénédiction, ainsi qu'à ma grand-mère à qui je souhaite
une longue vie.*

A mes chères sœurs Meriem, Sabrina

A mes chers frères Amine, Mohamed

A mon oncle Hannafi et ma tante Taous

A toute ma famille

A mes chers amis

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la
réalisation de ce mémoire*

Mounira

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chères :
A mes très chères parents source de tendresse et d'amour qui
m'ont tout donné et pour les sacrifices qu'ils ont consenti
pour mon instruction, que dieu les gardes et les entoure de
sa bénédiction.*

A mes chers frères Hakim, Farid, rabah, rachid et mokrane

A toute ma famille

A mes chers amis

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la
réalisation de ce mémoire*

Liste des abréviations et les symboles

TH : Taux d'humidité
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
CCM : Chromatographie sur couche mince
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
UV : Ultra Violet
R_f : Rapport frontal
AMM : Autorisation de mise sur le marché
IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50
DO : Densité optique
Da : Dalton
AG : Acide gallique
Flv : Flavonoïde
Tan : Tanins
Chlorure ferrique : FeCl₃
Chlorure d'Aluminium : AlCl₃
Chlorure de Sodium : NaCl
Magnésium métallique : Mg
FA : Fraction d'Acétate d'éthyle
FB : Fraction de n-butanol

Liste des figures

Fig. 01 : Marrubium vulgare L	3
Fig. 02 : Description botanique de Marrubium Vulgare L	3
Fig. 03 : Structure de base des polyphénols.....	7
Fig. 04 : Structure générale du noyau des flavonoïdes	8
Fig. 05 : Tanin condensé	11
Fig. 06 : Tanin hydrolysable.....	11
Fig. 07 : Structure chimique des alcaloïdes	11
Fig. 08 : Structure de l'isoprène (C ₅ H ₈	12
Fig. 09 : Vue générale de la plante Marrubium vulgare prise dans la région de REDJAOUNA située à 7 Km de la ville de TIZI OUZOU.....	13
Fig. 10 : Protocole d'extraction du matériel végétal.....	16
Fig. 11 : Protocole d'extraction des flavonoïdes de marrube blanc	19
Fig. 12 : Schéma des différentes étapes suivies lors de l'extraction des tanins	20
Fig. 13 : Forme libre et réduite de DPPH	24
Fig. 14 : Rendement en flavonoïdes des feuilles de Marrubium vulgare	28
Fig. 15 : Rendement en tanins des feuilles de Marrubium Vulgare.....	29
Fig. 16 : Chromatogramme HPLC de l'extrait flavonoidique de Marrubium vulgare	31
Fig. 17 :Chromatogramme HPLC de l'extrait tannique de Marrubium vulgare.....	31
Fig. 18 : Exemples de l'activité antibactérienne des extraits testés.....	32
Fig. 19 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'acide ascorbique	35
Fig. 20 : Densité optique en fonction de la concentration de composé tanins.....	35
Fig. 21 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par les tanins de Marrubium vulgare	36

Liste des tableaux

Tableau 01 : Principales classes de flavonoïdes.....	9
Tableau 02 : Liste des différents réactifs utilisés.....	15
Tableau 03 : Liste des souches bactériennes Utilisées.....	23
Tableau 04 : Résultats des tests phytochimiques.....	27
Tableau 05 : Rapports frontaux et couleur des taches avant et après la révélation par le chlorure d'aluminium $AlCl_3$ pour les flavonoïdes.....	29
Tableau 06 : Rapports frontaux et couleur des taches avant et après la révélation par chlorure d'aluminium $AlCl_3$ pour les tanins.....	30
Tableau 07 : Activité antibactérienne de l'extrait tannique sur milieu Mueller-Hinton.....	33
Tableau 08 : Activité antibactérienne de l'extrait flavonoïdique sur milieu Mueller-Hinton.....	34

SOMMAIRE

Introduction générale	1
------------------------------------	---

Chapitre I : Etude bibliographique sur la plante étudiée : Marrubium vulgare

I.1. Introduction.....	2
I.2. Historique.....	2
I.3. Genre Marrubium.....	2
I. 3.1. Présentation et description botanique	3
I. 3. 2. Le nom vernaculaire	4
I. 4. Localisation et répartition	4
I. 5. Composition chimique	4
I.6. Utilisation de la plante	5
I.7. Contre-indications et effets indésirables	5
I. 8. Travaux antérieurs.....	5

Chapitre II : Les métabolites secondaires

I. Introduction.....	6
II. Classification des métabolites secondaires.....	6
II.1. Les composés phénoliques.....	6
II.1.1. les flavonoïdes	7
II.1.1.1. Localisation et distribution.....	8
II.1. 2. Les tanins	10
II.1.2.1. Localisation et distribution.....	10
II-1-2-2- Classification.....	10
II.2. Les alcaloïdes	11
II.3. Les terpénoïdes (Isoprénoïdes et Stéroïdes	12
II.3. Les saponosides.....	12
II.4. Huiles essentielles	12

Chapitre III : Matériels et méthodes

I. Matériel et Méthodes	13
I. 1. Matériel végétal	13

I.2. Position systématique de la plante.....	14
I.3. Evaluation du taux d'humidité du matériel végétal	14
I.4. Réactifs utilisés.....	15
II. Méthode utilisée	15
II.1. Principe de la méthode d'extraction.....	15
II.2. Le screening phytochimique	17
II.3. Extraction des flavonoïdes	18
II.4. Extraction des tanins	20
II.5. Rendement des extraits tannique et flavonoïdique.....	21
II.6. Séparation des flavonoïdes par Chromatographie sur Couche Mince	21
II.7. Séparation des tanins par Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	22
II.8. Analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	22
II.9. Activité antibactérienne	22
II.10. activité anti oxydante	24

Chapitre VI : Résultats et discussion

I. Résultats.....	26
I.1. Taux d'humidité de la plante.....	26
I.2. Résultats de screening phytochimique	26
I.3. Rendement.....	27
I.4. Chromatographie sur couche mince des flavonoïdes	29
I.5. Chromatographie sur couche mince des tanins	30
I.6. Résultats des analyses par HPLC des extraits flavonoïdique et tannique	31
I.7. Résultats des tests microbiologiques	32
I.8. Résultat de l'activité antioxydante	35
I.8.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	35
Conclusion générale	37

Références bibliographiques

Glossaire

Annexe

Introduction générale

Introduction générale

Depuis que l'homme est sur terre, il utilise les plantes qui poussent autour de lui pour se nourrir et se soigner.

Dans le monde, 80% des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner et traiter certaines maladies (diabète, cancer, la grippe, hypertension,...) [1].

En Algérie, comme dans tous les pays du Maghreb et les pays en voie de développement, le recours à la médecine traditionnelle est largement répandu, et plusieurs remèdes à base de plantes utilisés individuellement ou en combinaison sont recommandés [2].

En effet, le règne végétal est une source jugée inépuisable de molécules pouvant présenter un intérêt thérapeutique. Dans ce contexte, une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude des métabolites secondaires qui constituent souvent les principes actifs des plantes médicinales et l'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites sur laquelle l'industrie pharmaceutique s'appuie largement pour le développement de nouveaux médicaments.

Marrubium vulgare L (marrube blanc) est utilisé dans plusieurs pays dans le traitement des inflammations, de la gastroentérite et des troubles respiratoires (asthme). Cette espèce possède également des propriétés hypotensives, antioxydants et insecticides [3].

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

D'autre part les plantes de la famille des lamiacées dont Marrubium vulgare sont réputées actives contre une variété de microorganismes et leur richesse en métabolites secondaires (flavonoïdes, tanins ...) [4]. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier cette plante dans le but d'identifier ses principaux métabolites secondaires et d'évaluer son pouvoir antibactérien et antioxydant.

Notre travail comporte une partie théorique dont recueil bibliographique sur le Marrubium vulgare L ainsi qu'un rappel sur les métabolites secondaires et une partie expérimentale constituée de :

- Un screening phytochimique permettant l'identification des différents constituants de la plante étudiée.
- Extraction des tanins et des flavonoïdes contenus dans le Marrube blanc ainsi que leur séparation par CCM et HPLC.
- Evaluation de l'activité antibactérienne des tanins et des flavonoïdes extraits.
- Etude du pouvoir antioxydants des tanins extraits vis-à-vis du radical libre DPPH.

**Chapitre I : Aperçu bibliographique sur
la plante étudiée : Marrubium vulgare**

I.1. Introduction

Depuis très longtemps, les plantes médicinales jouent un rôle déterminant dans la conservation de la santé des hommes et la survie de l'humanité. Elles sont un patrimoine sacré et précieux et constituent une réponse de choix pour fournir à l'organisme, de façon naturelle, les substances nécessaires pour maintenir son équilibre vital. Le marrube blanc (*Marrubium vulgare*) est une plante de la famille des lamiacées connue pour être utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies.

I.2. Historique

Dans l'Égypte de la haute Antiquité, le marrube était déjà reconnu pour ses propriétés apaisantes contre la toux. On s'en servait également comme insectifuge et comme antidote contre plusieurs poisons.

Les Grecs de l'Antiquité l'utilisaient contre les morsures de chiens enragés.

En médecine ayurvédique (Inde), chez les aborigènes d'Australie et les Amérindiens d'Amérique du Nord, le marrube servait à traiter les infections des voies respiratoires.

John Gerard, herboriste élisabéthain du XVI^e siècle, le recommandait contre les sifflements respiratoires.

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.

Cependant, en Europe, la plante est toujours inscrite dans les Pharmacopées nationales : on y fabrique nombre de sirops et de pastilles qui en renferment.

Jusqu'en 1900, la Pharmacopée des États-Unis reconnaissait l'usage du marrube pour traiter les infections des voies respiratoires [5].

I.3. Genre *Marrubium*

Marrubium vulgare ou marrube blanc (**Fig.01**) est une espèce très répandue dans le bassin méditerranéen et utilisé pour ses vertus thérapeutiques [6]. En Algérie, on retrouve 6 espèces différentes au sein de ce même genre : *Marrubium vulgare*, *Marrubium supinum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssoides* Pomel et *Marrubium desserti* de Noé [7].



Fig. 01 : *Marrubium vulgare* L.

I.3.1. Présentation et description botanique

C'est une plante herbacée pérenne de couleur grisâtre qui peut atteindre 25 à 45 cm de hauteur et qui présente une légère ressemblance avec la menthe. Les tiges carrées sont simples ou ramifiées, droites ou légèrement couchées à la base, blanches et cotonneuses. Les feuilles duveteuses sont opposées, pétiolées, ovales-arrondies, bordées de dents inégales, ridées et blanchâtres. Les fleurs sont petites, blanches, sessiles, disposées en verticilles serrés et globuleux dans toute la partie supérieure de la tige et des rameaux, et à l'aisselle des feuilles supérieures. La corolle possède deux lèvres, la lèvre inférieure est trilobée et la supérieure possède deux lobes. Quatre étamines sont cachées dans le tube de la corolle. Le calice est velu à 10 dents courtes et crochues. Enfin, quatre petits akènes sont cachés à la base du calice persistant. Ils sont lisses et glabres et mûrissent en automne (Fig. 02) [8].

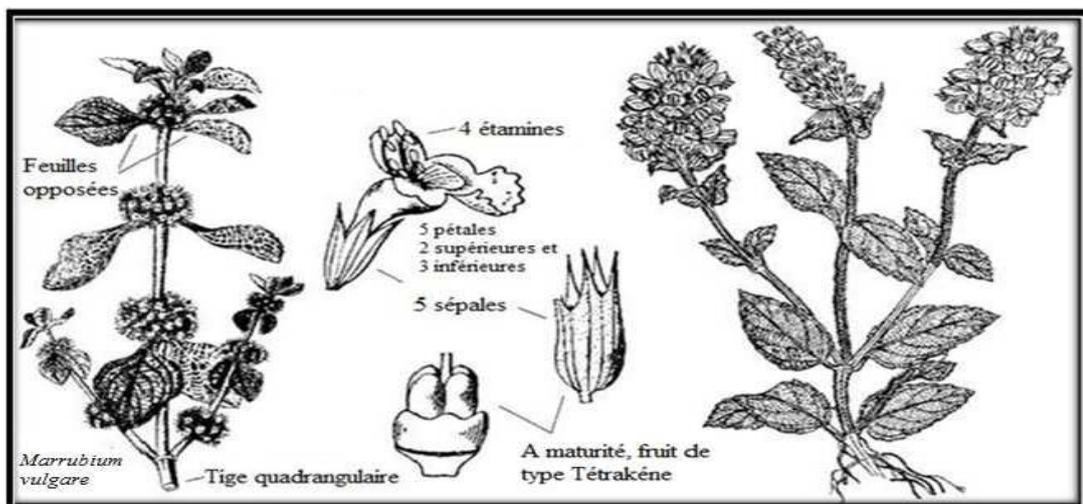


Fig. 02 : Description botanique de *Marrubium Vulgare* L.

I. 3. 2. Le nom vernaculaire

Les noms donnés à la plante sont les suivants :

Nom scientifique : Marrubium vulgare L [9].

En Algérie : Marrioua [9].

En français : Marrube blanc [7].

En anglais : Horehound [7].

Au Maroc : Merrîwt [10].

En Tunisie : Marroubia [11].

En Italien : Marrubbio [7].

Nom allemand : Weisser andron [12].

Nom espagnol : Marrubie [13].

I. 4. Localisation et répartition

Elle pousse dans toute l'Afrique du Nord et presque dans toute l'Europe, au centre et au Sud-ouest de l'Asie et aux Canaries [14]. Elle est naturalisée dans l'Amérique du Nord et dans l'Amérique du Sud [15].

I.5. Composition chimique

On y trouve des diterpènes amers de la série des furanolabdanes et surtout des composés de lactones : marrubiine principalement et son précurseur pré uranique, la prémarrubiine, mais aussi du pérégrinol, du vulgarol, du marrubénol et du marrubiol.

Il y a également des Hétérosides flavoniques du quercétol, de la lurtéoline ou de l'apigénine, mais aussi des lactoylflavones, et quelques dérivés de l'acide ursolique.

En outre il y a des tanins spécifiques des Lamiacées et dérivés de l'acide hydroxycinnamique (jusqu'à 7%) (Acide chlorogénique, caféique, caféylquinique, mais absence d'acide rosmarinique). Toutefois la présence d'une faible quantité d'huiles essentielles comportant différents composés mono terpéniques (moins de 1% : α -pinène, camphène, limonène) [6].

I. 6. Utilisation de la plante

Le marrube blanc est très utilisé en médecine traditionnelle comme expectorant, antispasmodique, antidiabétique et en cas d'infections respiratoires. Il est aussi employé pour combattre la cellulite et l'obésité [16]. Plusieurs de ces utilisations traditionnelles ont été confirmées par des essais scientifiques [17].

I.7. 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.

I.8. Travaux antérieurs

Certains travaux ont été réalisés sur l'espèce *Marrubium vulgare* qui ont révélé la présence de plusieurs métabolites secondaires dans la partie aérienne tels que les diterpènes dont la marrubiine responsable de la majorité des propriétés biologiques de cette espèce [18], les flavonoïdes [19], ainsi que plusieurs phénylpropanoïdes esters tels que verbascosides [20].

Une autre étude effectuée sur l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Marrubium vulgare* a permis d'identifier deux produits phénylethanoïdique : le Marruboside et le Marruboside acétylé [21].

L'étude de l'activité antibactérienne des tannins extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* a révélé que ces composés possèdent un pouvoir antibactérien important vis-à-vis des souches bactériennes pathogènes et multi résistantes : *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* [6].

A large, horizontally-oriented oval with a solid red fill and a thin white border, centered on the page. It serves as a background for the chapter title.

Chapitre II : Les métabolites secondaires

I. Introduction

Les plantes ont acquis la capacité de synthétiser et d'accumuler un nombre élevé de petites molécules de structure variée, connues sous le nom de métabolites secondaires. Ce sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction [22].

II. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes produits en très faible quantité, On peut les classer en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine [23].

II.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal [24], caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside,...etc

Ils sont présents dans tous les fruits et légumes [25]. Plus de 8000 structures ont été identifiées à partir de simples molécules comme les acides phénoliques, jusqu'aux substances hautement polymérisées comme les tanins [26].

Ces molécules constituent la base des principes actifs trouvés au niveau des plantes médicinales. Ils possèdent un effet antioxydant, antibactérien et antifongique [27].

➤ Structure chimique

La structure chimique des polyphénols est comparable à tous les polyphénols. Ils sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. (Fig. 03) [28].

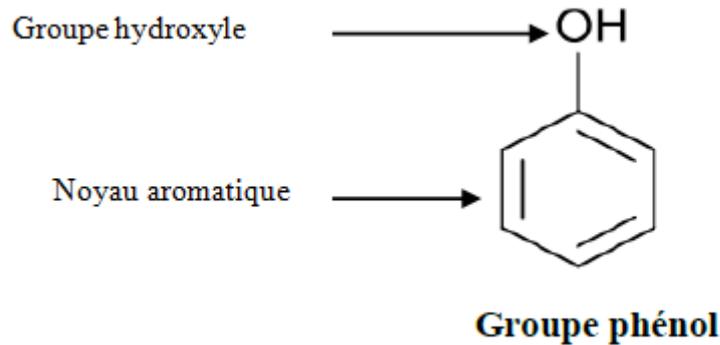


Fig. 03 : Structure de base des polyphénols

Les principales classes de composés phénoliques sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins.

II.1.1. les flavonoïdes

Désigne une très large gamme de composés naturels, ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. A l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides.

Du point de vue structural, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules. En effet plus de 6400 structures ont été identifiées [29].

➤ Structure chimique et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- γ -pyrène [30]. Leur structure de base est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone ($C_6-C_3-C_6$), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (**Fig.04**) [31].

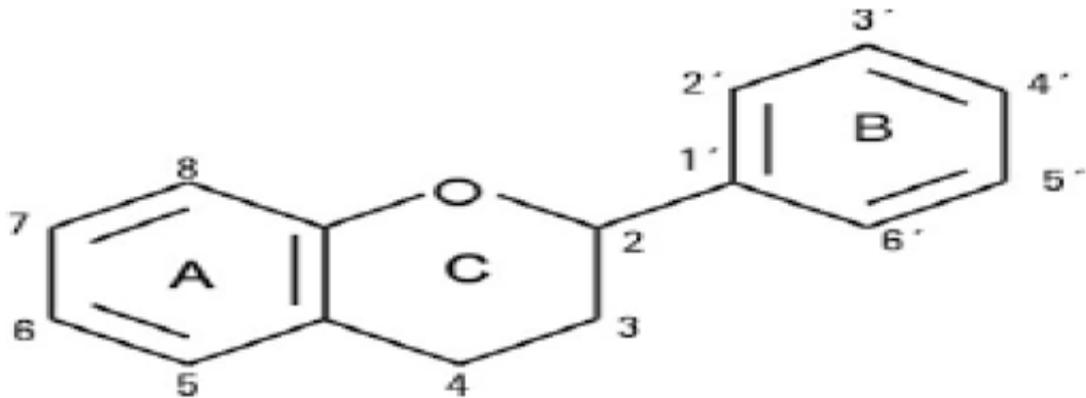


Fig. 04 : Structure générale du noyau des flavonoïdes [32].

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: Flavones, isoflavandiol, flavanols, flavonols, auronnes, chalcones, anthocyanes [33].

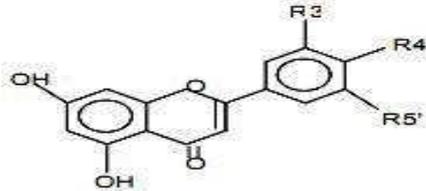
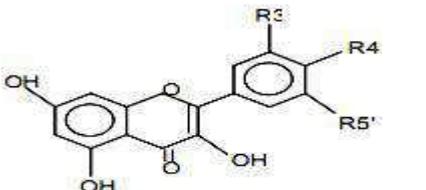
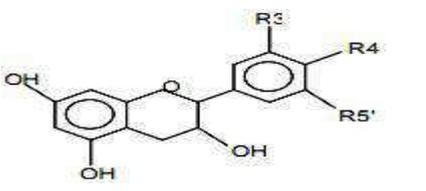
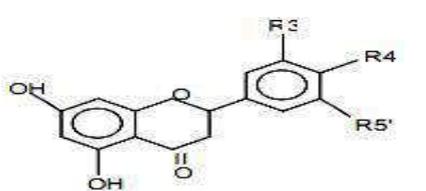
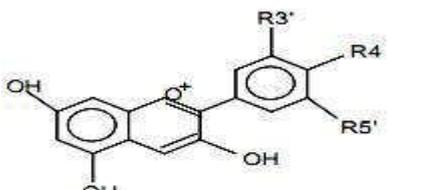
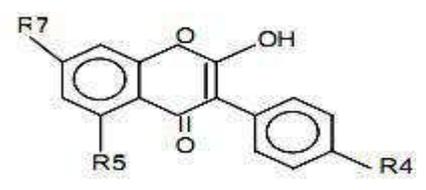
II.1.1.1. Localisation et distribution

Les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal, ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes [34].

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques [32].

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, ils peuvent être regroupés en plusieurs classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central.

Le tableau 01 : les Principales classes des flavonoïdes [6].

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavanols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
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
		OH	O-Glu	H	Daidzeine

II.1. 2. Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variées, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da [35].

II.1.2.1. Localisation et distribution

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les fagacées, les rosacées [36].

Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines [37].

II-1-2-2-Classification

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique: Les tanins hydrolysables et les tanins condensés [32].

a-Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de ce dernier, on distingue: les tanins galliques, et les tanins ellagiques (**Fig.06**) [35].

a-1-Tanins galliques (Gallo tanins)

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

a-2- Tanins ellagiques (Ellagitanins)

Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique [35].

b-Tanins condensés

Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine. Les tanins condensés sont des molécules non

hydrolysables, leur structure est voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (**fig.05**) [35].

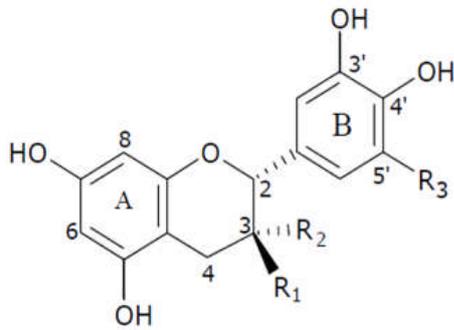


Fig.0 5 : Tanin condensé [38].

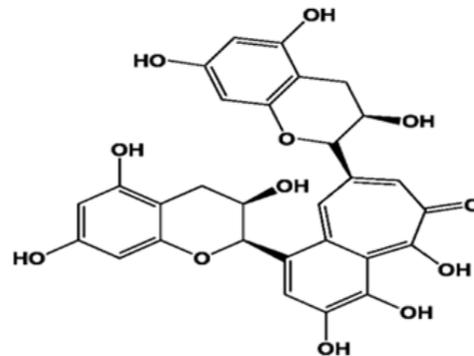


Fig. 06 : Tanin hydrolysable [38].

II.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine végétale, azotée, à caractère alcalin. Ils possèdent des structures hétérocycliques et se retrouvent dans environ 20% de toutes les espèces de plantes [39].

Leurs structures moléculaires sont complexes, douées des propriétés physiologiques prononcées même à faible dose [40]. Ils constituent un des groupes de métabolites secondaires contenant plus de 10000 à 12000 structures (**Fig. 06**) [41].

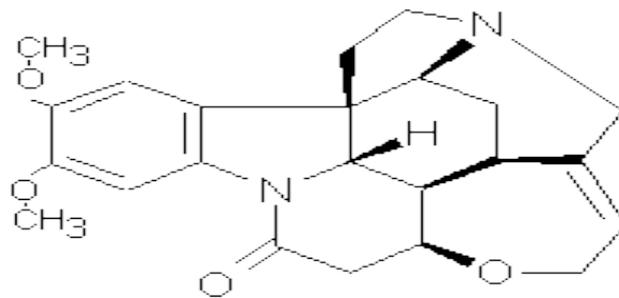


Fig. 07 : Structure chimique des alcaloïdes [Morphine].

II.3. Les terpénoïdes (Isoprénoïdes et Stéroïdes)

Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux.

Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C_5H_8), communément appelée isoprène (**Fig. 07**). Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en : monoterpénoïdes (C_{10}), sesquiterpénoïdes (C_{15}), et diterpénoïdes (C_{20}) [6].

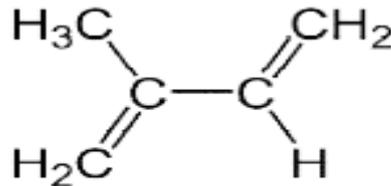


Fig. 08: Structure de l'isoprène (C_5H_8).

II.3. Les saponosides:

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires explique leur comportement moussant en solution aqueuse.

Les saponosides peuvent être classés en deux groupes selon la nature de leur génine : saponosides à génine stéroïdiques et saponosides à génine triterpéniques [32].

II.4. Huiles essentielles

Il s'agit de substances particulièrement aromatiques (à l'odeur généralement agréable). En outre, elles sont souvent très volatiles et ont donc tendance à s'évaporer facilement, ce qui confère aux végétaux leurs parfums caractéristiques. Elles se présentent, en général en émulsion, formant des gouttes plus ou moins grosses, qui s'écoulent à l'extérieur de la plante par des canaux excréteurs [42]. Parmi les innombrables substances présentes dans les huiles essentielles, on rencontre:

- des carbures terpéniques (limonène, phellandréne), des carbures saturés, des alcools (bornéol, menthol), des phénols (thymol, carvacrol, eugénol).

Chapitre III : Matériel et méthode

I. Matériel et Méthodes

I. 1. Matériel végétal

L'espèce sélectionnée a été collectée dans son habitat naturel. Le Marrubium vulgare est récolté dans la région de REDJAOUNA située à 7 Km de la ville de TIZI OUZOU entre le mois de Mars et le mois d'Avril 2017. Le matériel végétal est séché à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Après séchage, il a été broyé et stocké soigneusement dans un endroit sec en vue de l'analyser ultérieurement (**Fig.09**).



Fig. 09 : Vue générale de la plante Marrubium vulgare prise dans la région de REDJAOUNA située à 7 Km de la ville de TIZI OUZOU.

I.2. Position systématique de la plante

L'identification de la plante a été faite par Mr : BEN GHANEM ABD ELKADIR (MAA), Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques, Département Agronomie, Université Mouloud Mammeri de TIZI OUZOU.

Marrubium vulgare appartient au :

Règne : Végétal

Sous règne : Plantes vasculaire

Division : Magnoliophytes

Classe : Eudicotylédones.

Sous Classe : Gamopétale.

Ordre : Lamiales.

Famille : Lamiacées.

Genre : Marrubium.

Espèce : Marrubium vulgare L

Nom binomial : Marrubium vulgare

I.3. Evaluation du taux d'humidité du matériel végétal

La détermination de la teneur en eau de Marrubium vulgare a été réalisée par séchage de 5 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 :

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

M_1 : Masse initiale d'échantillon (en g) ;

M_2 : Masse après séchage (en g) ;

TH : Taux d'Humidité en %.

I.4. Réactifs utilisés

Les différents réactifs utilisés sont enregistrés dans le **tableau 02**

Fournisseur	Réactif	Formule chimique	Degré de pureté
SIGMA-ALDRICH^R	Méthanol	CH ₃ OH	99,7 %
	Ethanol	C ₂ H ₅ OH	96%
	Butanol-2	C ₄ H ₇ OH	37%
	Acide chlorhydrique	HCl	100%
	Anhydride Acétique	C ₄ H ₆ O ₃	
Prolabo^R	Dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂	99.9%
	Chloroforme	CHCl ₃	
	Acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂	100%
	Iodure de potassium	KI	100%
	Ether de pétrole	CH ₃ -(CH ₂) _n -CH ₃	100%
Panreac^R	Chlorure de Sodium	NaCl	
	Chlorure ferrique	FeCl ₃	
Biochem^R	Acide Sulfurique	H ₂ SO ₄	95%-97%
Riedel de Haen^R	Iode	I ₂	2%

II. Méthodes utilisées

II.1. Principe de la méthode d'extraction

L'extraction est effectuée par la méthode de macération qui consiste à laisser séjourner, c'est-à-dire à la température ambiante, un corps solide quelconque dans un liquide qui se charge des principes solubles de ce corps.

- Préparation de l'extrait aqueux et des extraits à polarité croissante

Les différentes étapes d'extraction sont regroupées dans la (Fig. 10).

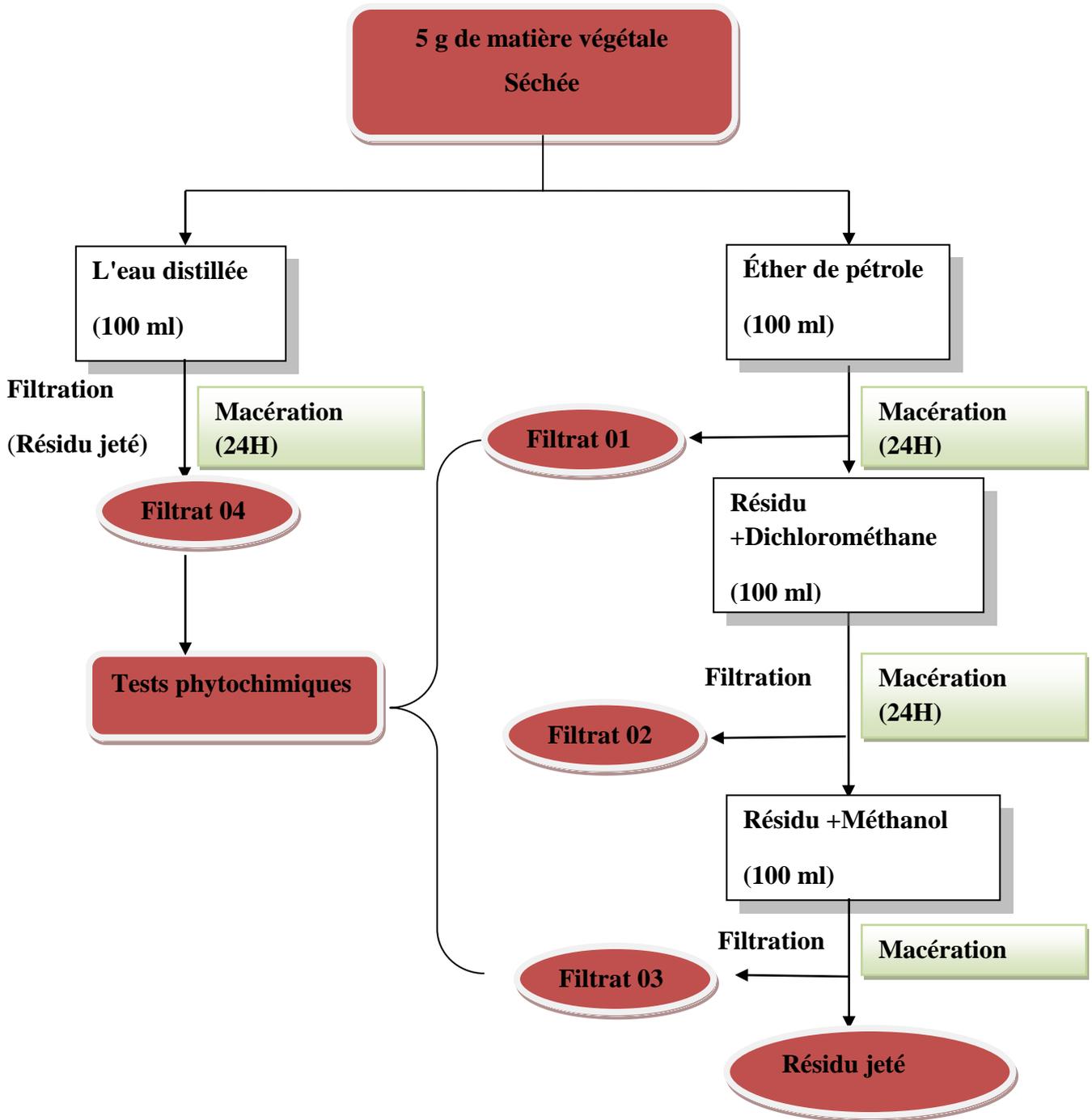


Fig. 10 : Protocole d'extraction du matériel végétal

II.2. Le screening phytochimique

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation effectuée sur les extraits préparés précédemment dans le but de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains composés chimiques : les flavonoïdes, les tanins, les saponines, Stérols et triterpènes.....Ces tests sont réalisés en présence de certains réactifs de caractérisation selon les méthodes décrites par Trease et Evans, et Harborne [43].

- **Tests phytochimiques**

- **Amidon**

Le test effectué consiste à : Chauffer 5 ml de l'extrait (aqueux, éther de pétrole, Dichlorométhane, méthanol) 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 [9].

- **Saponosides**

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse [5]. Leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait. Après agitation, laisser reposer le mélange pendant 20 minutes, et la teneur en saponosides est évaluée:

Pas de mousse = test négatif

Mousse moins de 1cm = test faiblement positif

Mousse de 1-2 cm = test positif

Mousse plus de 2 cm = test très positif

- **Tanins**

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1 ml de l'extrait (aqueux, Ether de pétrole, Dichlorométhane, méthanol) 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 [40].

- **Flavonoïdes**

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait (aqueux, Ether de pétrole, Dichloro méthane, méthanol) 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 [23].

➤ **Alcaloïdes**

Dans deux tubes à essai, introduire 1 ml de l'extrait à analyser (aqueux, éther de pétrole, Dichloro méthane, méthanol). 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 [41,42].

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

Dans un tube à essai, introduire 5 ml de l'extrait à analyser (aqueux, éther de pétrole, Dichloro méthane, méthanol), ajouter 5ml d'anhydride acétique, 5ml de chloroforme et 1 ml d'acide sulfurique 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 [40].

➤ **Terpénoïdes : Test de Slakowski**

Dans un tube à essai, ajouter à 2,5ml d'extrait (aqueux, éther de pétrole, Dichloro méthane, méthanol) 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 [41,42].

➤ **Glycosides cardiaques**

2 ml de chaque extrait (aqueux, éther de pétrole, Dichloro méthane, méthanol) 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.

➤ **Anthocyanes**

Les anthocynes sont révélés par l'ajout de 1 ml d'extrait (aqueux, éther de pétrole, Dichloro méthane, méthanol), 3 ml de H₂SO₄ concentré et 1 ml de NH₄OH, si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu en milieu basique, on peut conclure la présence des anthocyanes.

II.3. Extraction des flavonoïdes

5g de la drogue (feuilles) est macérée pendant 24 heures à température ambiante, dans un mélange méthanol/eau (70:30 v/v) respectivement. 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 10 ml d'H₂O. Enfin, la liqueur est épuisée dans une ampoule à décantation en trois étapes successive par l'éther, l'acétate d'éthyle et n-butanol. Les extraits butanolique et l'acétate d'éthyle est ensuite évaporé à l'aide d'un rota vapeur. Le résidu est ensuite conservé à une température de 4°C (Fig. 11).

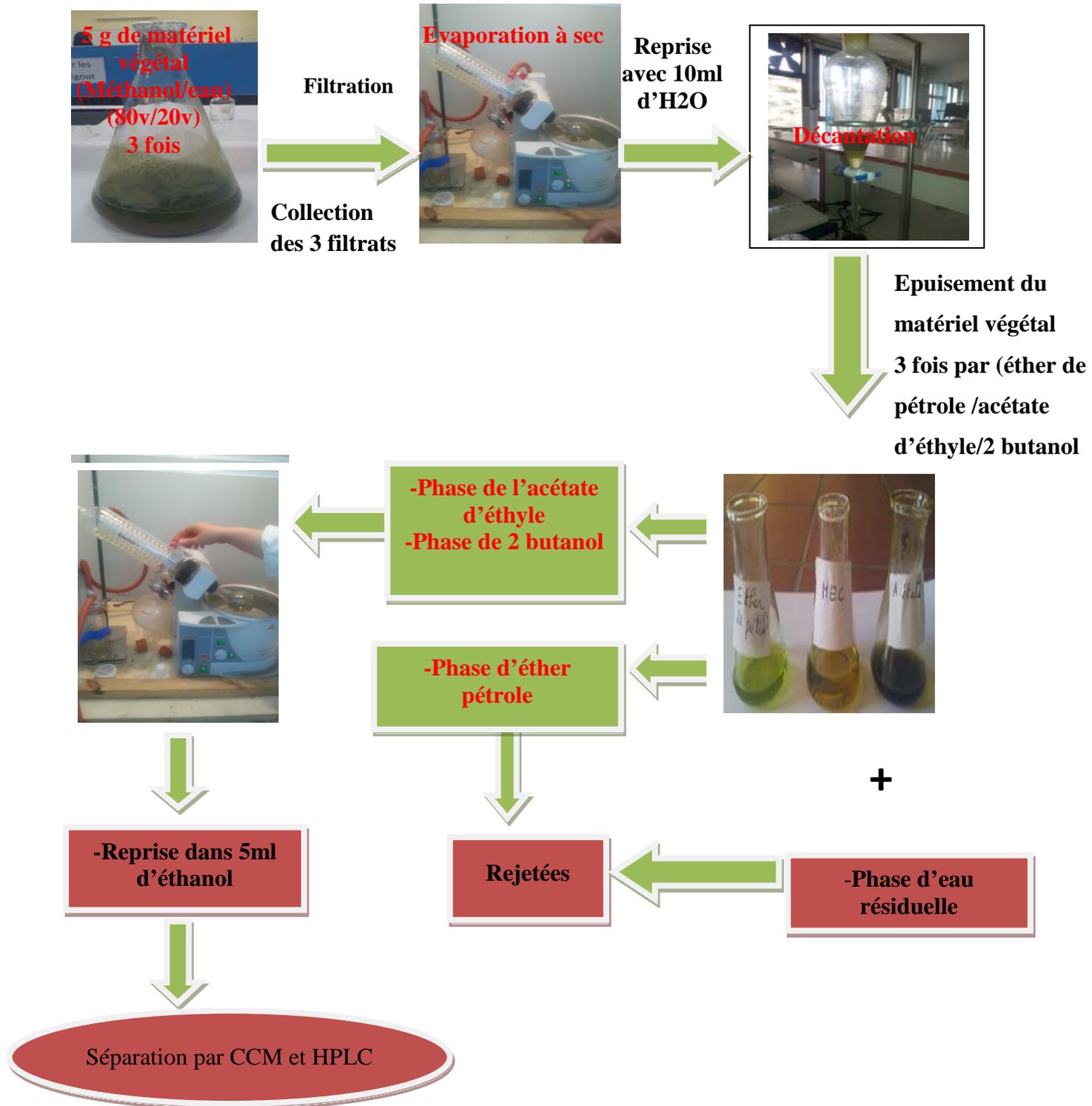


Fig. 11 : Protocole d'extraction des flavonoïdes de marrube blanc.

II.4. Extraction des tanins

D'après la méthode de Sowunmi et *al.* [44]; qui consiste à faire macérer 5g de drogue séchée pendant 24 heures sous agitation magnétique dans un mélange d'éthanol et d'eau bouillante (20ml/50ml). Après filtration La liqueur obtenue est épuisée dans une ampoule à décantée plusieurs fois par le chloroforme. Après l'évaporation de la phase organique, le résidu est repris par 10 ml de méthanol. Les différentes étapes de l'extraction des tanins sont représentées dans la figure suivante (Fig. 12).

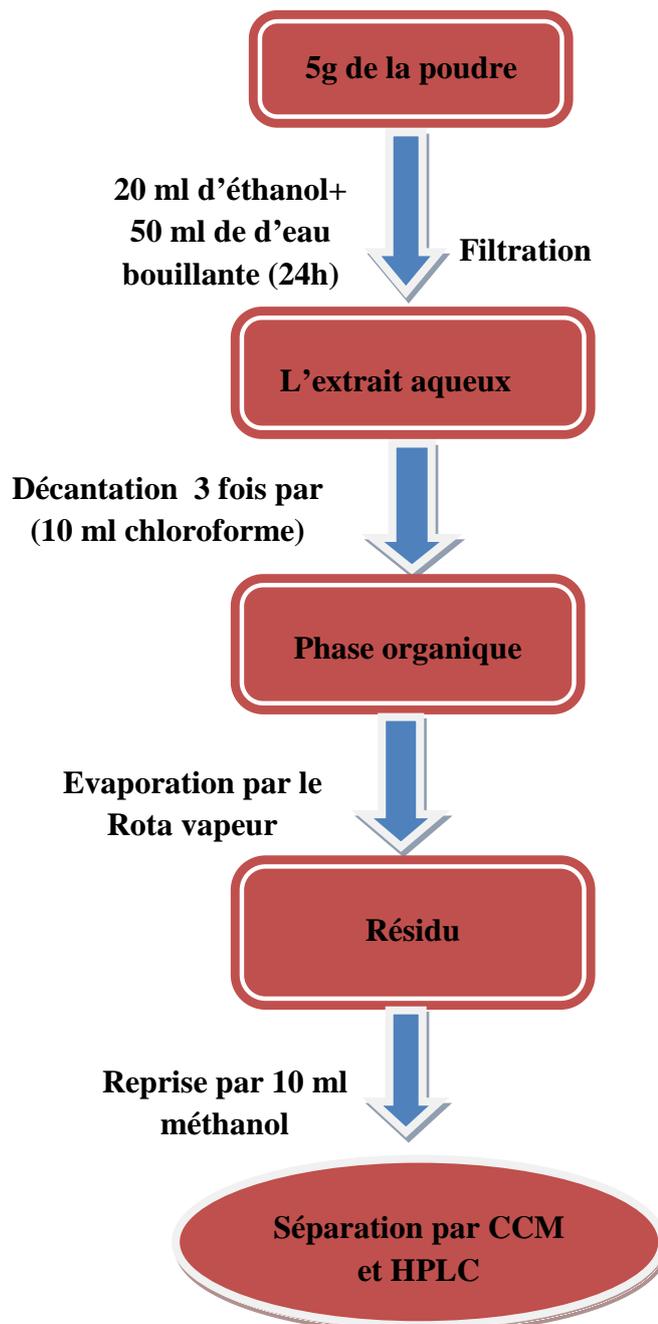


Fig.12 : Schéma des différentes étapes suivies lors de l'extraction des tanins.

II.5. Rendement des extraits tannique et flavonoïdique

Le rendement des extraits tannique et flavonoïdique 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 :

$$R\% = \frac{Me}{Ms} \times 100$$

R% : Rendement en %.

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

Ms : Masse de la plante sèche.

II.6. Séparation des flavonoïdes par Chromatographie sur Couche Mince

- **Principe de la méthode**

Afin d'avoir une idée sur la composition chimique de nos extraits, nous avons effectué un criblage phytochimique par CCM. C'est une technique analytique utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption et s'applique aux molécules pures, aux extraits et aux échantillons biologiques.

La séparation s'effectue par migration des molécules à travers la phase stationnaire dans un solvant ou un mélange de solvants appropriés (phase mobile) [45].

- **Le choix de la phase mobile**

Plusieurs systèmes de solvants sont exploités durant cette manipulation, le choix de système est basé sur ceux qui donnent les meilleures séparations (migrations).

Pour avoir les empreintes flavoniques et tannique des deux extraits et avoir une idée sur les bons systèmes de séparation et isolement. On a essayé plusieurs systèmes solvants et on a gardé celui qui donne autant de taches.

Les flavonoïdes extraits dont le système choisis (phase mobile) est un mélange d'Acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau (5V/2V/1V).

- **Révélation**

La révélation est faite sous une lampe à UV (Ultra Violet) 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 à 95°. Le chlorure d'aluminium provoque le changement de la couleur des taches obtenues.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son rapport frontal R_f , calculé par la formule suivante :

$$R_f = \frac{d}{D}$$

d : la distance parcourue par la molécule ;

D : la distance parcourue par la phase mobile (front du solvant).

II.7. Séparation des tanins par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Après une série d'essais réalisée 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 l'Acétate d'éthyle qui nous semble comme étant le meilleur éluant.

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 %.

II.8. Analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Cette analyse a été réalisée par un appareil HPLC (SHIMADZU LC20).

20 μ l de chaque extrait ont été injectés sur une colonne de type phase inverse C18, de dimensions égales à 125× 4.6 mm. La phase mobile est constituée de trois éluants : l'eau distillée, méthanol, acide acétique (50 : 47 : 2.5) (v/v/v), le gradient d'élution appliqué est de type isocratique étalé sur 10 min. Le débit est de 1 ml/ min [46].

La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à une longueur d'onde (280 nm).

II.9. Activité antibactérienne

Ce test est réalisé au niveau du Laboratoire de Recherche Microbiologie, Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques, Département Biologie, Université Mouloud Mammeri de TIZI OUZOU.

Extraits de Marrubium vulgare

Deux extraits ont été testés dans cette partie, un extrait flavonoïdique et un extrait tannique. Les solutions des extraits sont préparées dans le DMSO. Les dilutions sont préparées de façon à obtenir des concentrations au 1/2, 1/4 et 1/8 à partir de la solution mère.

Souches testées

Quatre souches bactériennes ont été choisies pour leur haute pathogenicité et leur multi résistance. Ce sont des espèces Gram négatif /ou Gram positif, il s'agit de : Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus (**Tableau 03**).

Tableau 03 : Liste des souches bactériennes utilisées.

Famille	Genre et espèce	Gram
Enterobacteriacées	Escherichia coli	Négatif
Staphylococcacées	Staphylococcus aureus	Positif
Pseudomonadacées	Pseudomonas aeruginosa	Négatif
Bacillaceae	Bacillus cereus	Positif

Méthode utilisée

Le pouvoir antibactérien des deux substances naturelles extraites des feuilles de Marrubium vulgare a été déterminé sur un milieu : gélose de Muller Hinton. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de diffusion sur milieu solide [47]. C'est une méthode similaire à celle de l'antibiogramme qui consiste à déterminer la sensibilité d'une souche microbienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs produits. L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque de papier wattman imbibés dans l'extrait à différentes concentrations [48].

a- Repiquage des souches bactériennes

Les souches bactériennes à tester ont été repiquées par la méthode des stries dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive, puis incubées pendant 24 h à 37°C afin d'obtenir des colonies isolées.

b- Préparation de l'inoculum

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.

c- Préparation des milieux de culture

La gélose de Muller Hinton est coulée et répartie dans des boîtes de pétri stériles. Ces dernières sont séchées pendant 30 min à une température ambiante avant leur emploi.

d- Ensemencement

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage en stries serrées. En tournant la boîte d'environ 60°, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries sur les boîtes.

Molécules de références : antibiotique

La gentamicine est un antibiotique de la famille des aminoglycosides utilisé pour traiter divers types d'infections bactériennes, en particulier celles provoquées par des bactéries à Gram-négatif.

Le méropénem (Belgique, Suisse) ou méropénème (France) est un antibiotique de la classe des carbapénèmes. En 2008, le laboratoire Astra Zeneca a obtenu, auprès des autorités françaises, une nouvelle AMM pour traiter *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* dans cette situation.

II.10. activité anti oxydante

➤ Principe :

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH[•] (2,2-Diphényl-1-picryl Hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2-Diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (Fig. 13) [49].

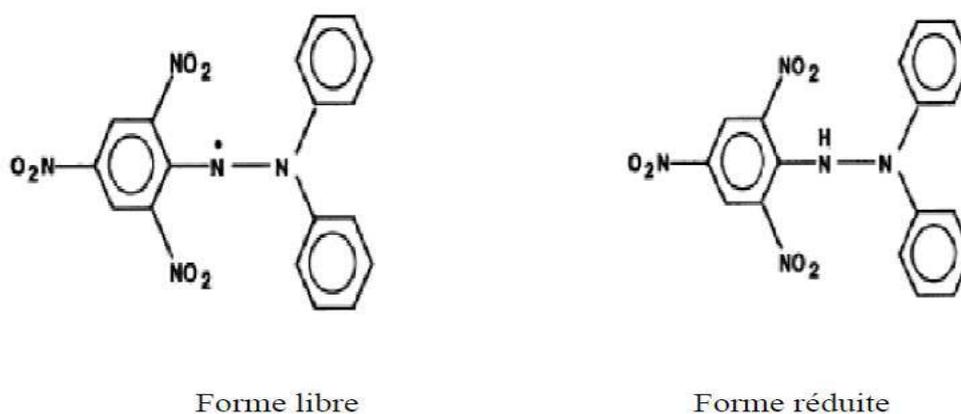


Fig. 13 : Forme libre et réduite de DPPH[•] [50].

➤ Mode opératoire

Un volume de 40 μ l, de chaque échantillon de chacune des concentrations 8,4, 1,0.125, 0,0781 mg/ml, est ajouté à 2ml d'une solution de radicaux DPPH[•] dissout dans le DMSO. Le mélange est laissé pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance obtenue pour chaque produit testé est comparée à celle obtenue pour l'acide ascorbique pris comme contrôle positif.

La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à une longueur d'onde (517 nm).

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode de DPPH[•] est exprimée en pourcentage d'inhibition selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad \text{où}$$

A_0 : absorbance du contrôle (solution de DPPH sans extrait).

A_1 : absorbance en présence de l'extrait.

Chapitre IV : Résultats et discussion

I. Résultats

I.1. Taux d'humidité de la plante

$$\text{TH} = 65.4 \%$$

Le taux d'humidité évalué pour les feuilles de Marrubium vulgare est de **65.4 %**. Ceci signifie que plus de la moitié du poids de la plante que nous avons utilisé est constituée d'eau.

I.2. Résultats de screening phytochimique

Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau N° 04**:

Tableau 04 : Résultats de tests phytochimiques.

		Partie aérienne Marrubium vulgare			
Les tests phytochimiques		Extrait aqueux	Extrait éther de pétrole	Extrait de dichlorométhane	Extrait méthanolique
Métabolites secondaires	Réactifs	Résultats			
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	-	-	-	-
Terpénoïdes	Test de Slakowski	+	-	-	+
Alcaloïdes	Mayer	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif,

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaire (Tanins, flavonoïdes, Terpénoïdes, Saponosides) au niveau des tissus végétaux de la plante étudiée. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation, un changement de couleur.

Les résultats obtenus des tests phytochimiques, des différentes préparations de la partie aérienne du *M. vulgare*, ont révélé la richesse de cette plante en tanins, flavonoïde, Stéroïdes, des terpénoïdes et saponosides dans les extraits méthanolique et aqueux.

Par contre, les tests des Stérols et Triterpènes et des Anthocyanes sont marqués négatifs dans les différentes préparations.

De même, nous avons enregistré que les extraits éther de pétrole et dichlorométhane sont très pauvres en métabolites secondaires.

I.3. Rendement

➤ Rendement de flavonoïdes

Le rendement des flavonoïdes dans la fraction d'acétate d'éthyle au niveau des feuilles correspond à un pourcentage égal à **9,4 %** et dans la fraction butanolique à **13,4 % (Fig.14)**.

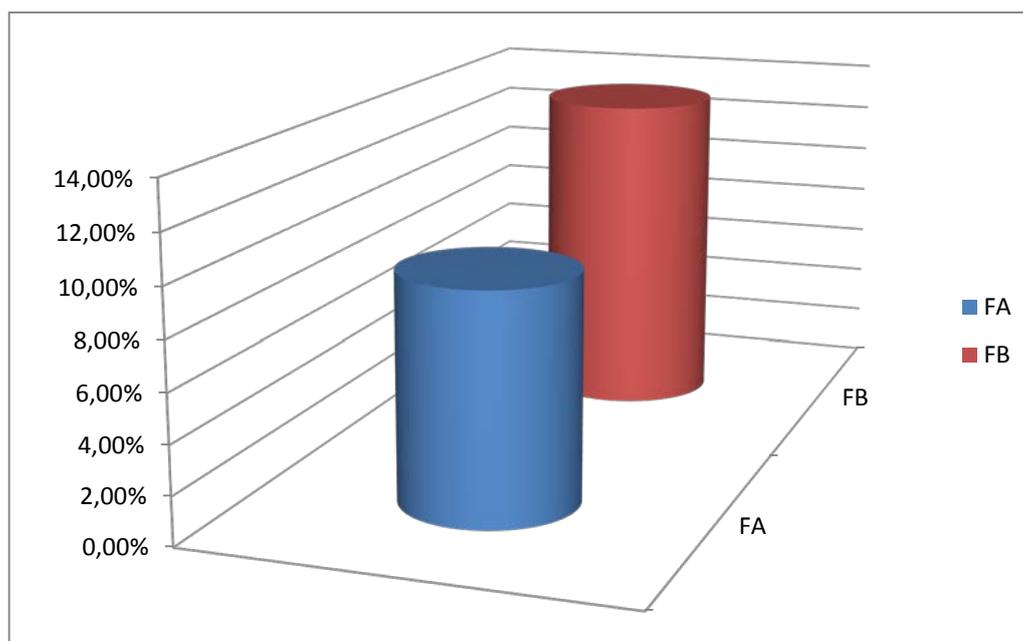


Fig.14 : Rendement en flavonoïdes des feuilles de Marrubium vulgare.

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].

➤ Rendement des 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 de **19 %**. L'espèce de Marrubium vulgare étudiée renferme en plus des flavonoïdes, des quantités assez importantes en tanins (**Fig.15**). Ces résultats sont meilleures par rapport a ceux obtenus dans l'étude de Djahra [6].

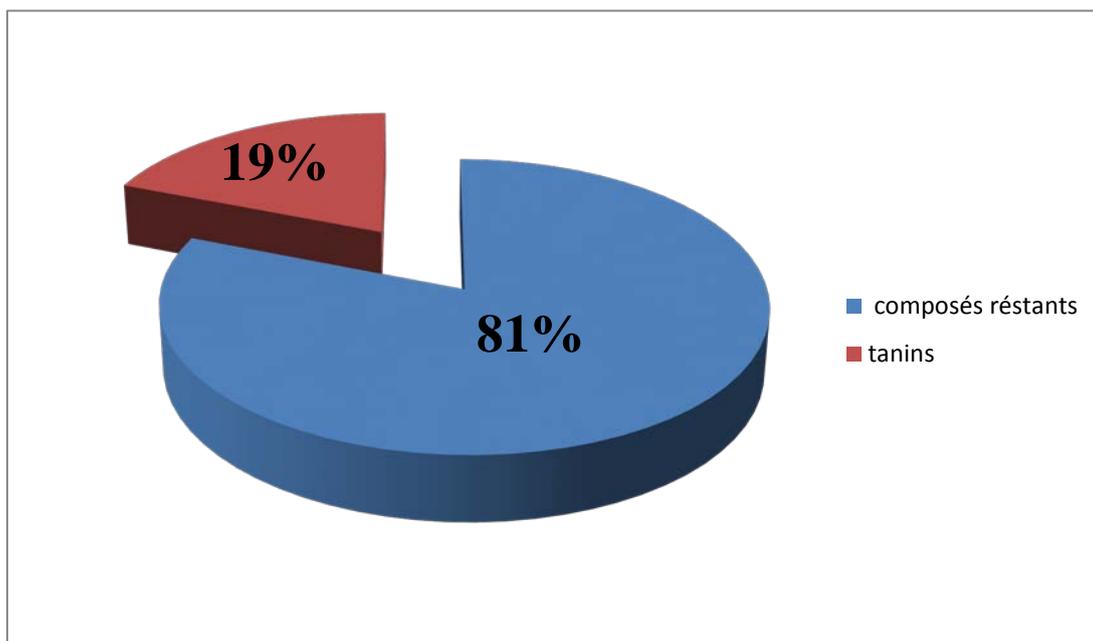


Fig.15 : Rendement en tanins des feuilles de Marrubium Vulgare.

I.4. Chromatographie sur couche mince

➤ flavonoïdes

Les résultats obtenus par la CCM sont résumés dans le **tableau N° 05**

Tableau 05 : Rapports frontaux et couleur des taches avant et après la révélation par le chlorure d'aluminium $AlCl_3$ pour les flavonoïdes

	Taches	Rapports frontaux (Rf)	Couleur	
			Avant ajout d' $AlCl_3$	Après ajout d' $AlCl_3$
Acétate d'éthyle	Taches 1	0,32	Brune	Jaune
	Taches 2	0,82	Brune	Jaune
	Taches 3	0,95	Brune	Verte
Butanol	Taches 1	0,77	Brune	Jaune
	Taches 2	0,85	Brune	Jaune
	Taches 3	0,93	Brune	Verte

La séparation par CCM de l'extrait d'acétate d'éthyle obtenu a montré la présence de trois taches ayant des rapports frontaux différents **0,32 ; 0,82 ; 0,95**, et que l'extrait butanolique a décelé aussi trois taches de la même couleur ayant les rapports frontaux **0,77 ; 0,85 ; 0,93**.

La confirmation de la présence des flavonoïdes est faite par l'ajout de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2 % dilué dans du méthanol à 95°. Ce dernier provoque en présence des flavonoïdes un changement de couleur des taches vers le jaune, jaune vert ou ocre. (Fig.12). En effet, les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en position 5 susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^{3+} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présents dans l'extrait.

I.5. Chromatographie sur couche mince des tanins

Tableau 06 : Rapports frontaux et couleur des taches avant et après la révélation par le chlorure d'aluminium AlCl_3

	Taches	Rapports frontaux (R_f)	Couleur	
			Avant ajout d' AlCl_3	Après ajout d' AlCl_3
Tanins	Taches 1	0,65	Brune	Jaune pâle
	Taches 2	0,85	Brune	Jaune
	Taches 3	0,95	Brune	Verte
Acide gallique	Taches 1	0,65	Brune	Brune

Les taches obtenues sont en nombre de trois avec des rapports frontaux compris entre 0,65 et 0,95, toutes de couleur brune. L'ajout du réactif de Chlorure d'Aluminium AlCl_3 a provoqué une modification de la couleur des taches. Les couleurs ont viré du brun à la jaune pale, jaune et vert. Ces différentes couleurs obtenues confirment la nature des molécules tanniques.

L'utilisation de l'acide gallique comme une référence indique que la première tache de l'extrait tannique revient à l'acide gallique.

I.6. Résultats des analyses par HPLC des extraits flavonoïdique et tannique

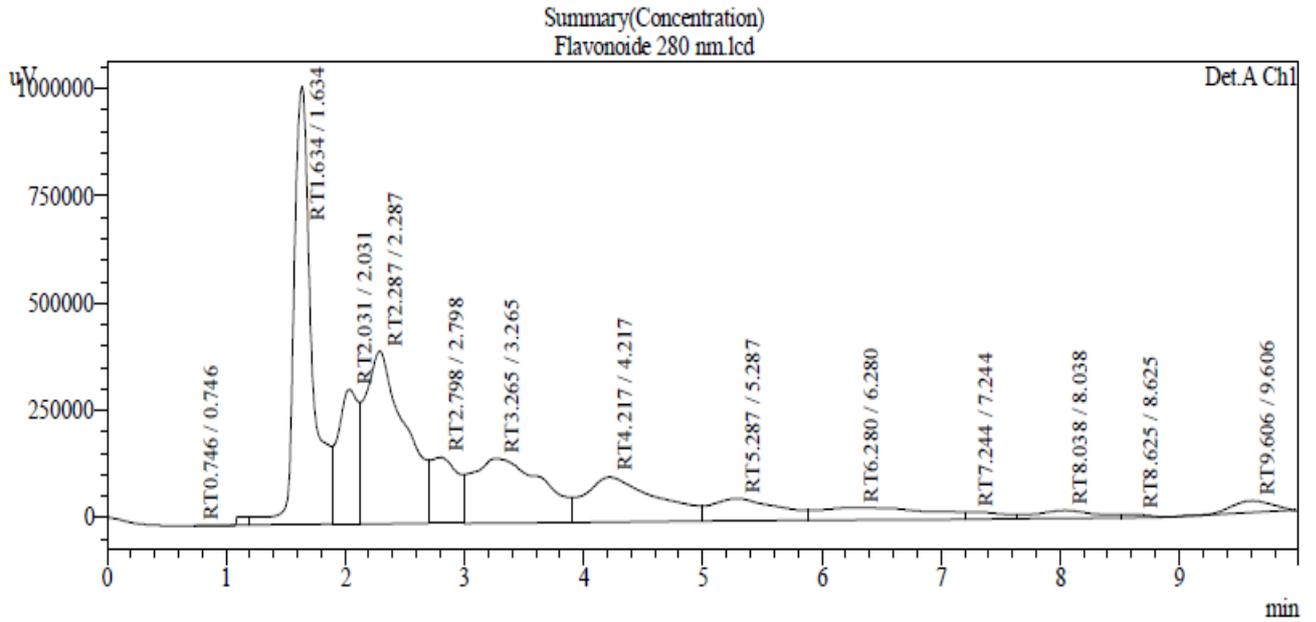


Fig. 16 : Chromatogramme HPLC de l'extrait flavonoïdique d'acétate d'éthyle de Marrubium vulgare.

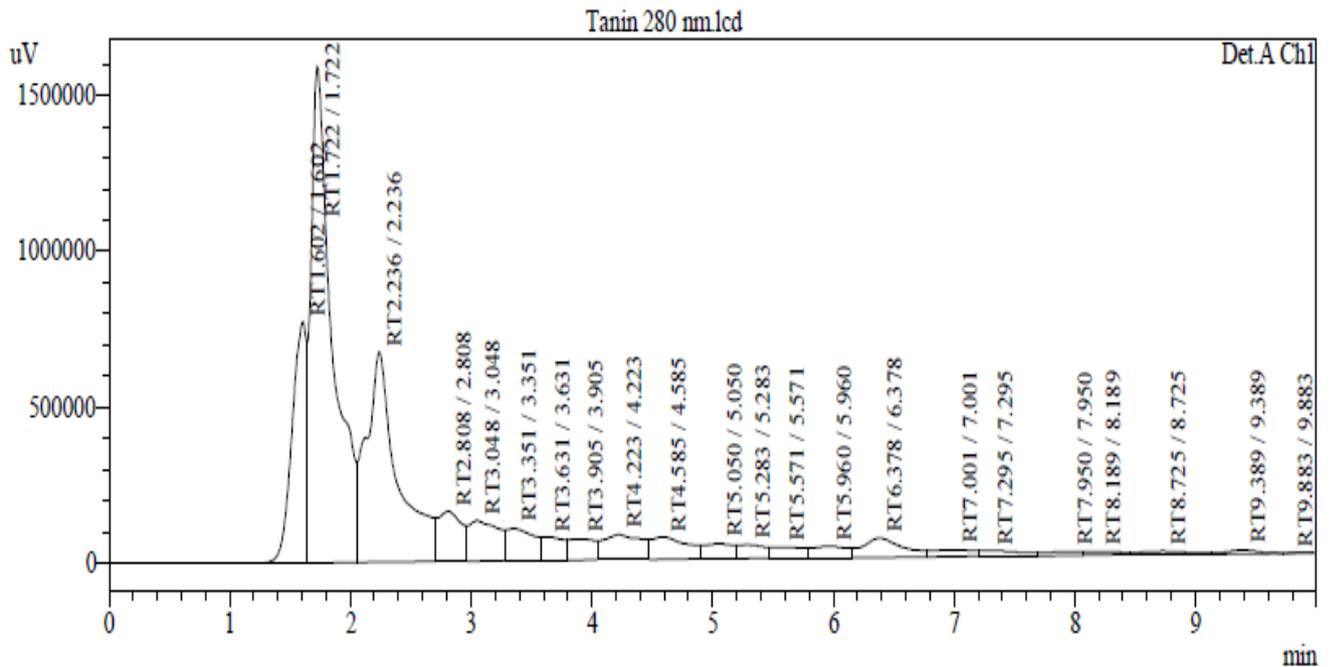


Fig. 17 : chromatogramme HPLC de l'extrait tannique de Marrubium vulgare.

Les profils HPLC représentés ci-dessus montrent des composés mentionnés par leurs pics et leurs temps de rétention dans les spectres des deux extraits étudiés.

L'extrait flavonoïdique est représenté par un chromatogramme divisé également en trois parties dont les pics majoritaires sont au nombre de deux et ayant des temps de rétention de 1,63 et 2,28 min

Le chromatogramme de l'extrait tannique est moins étoffé en molécules tanniques, il est représenté par trois pics entre 1,60 et 6,37 min dont un pic majoritaire avec un temps de rétention de 1,72 min.

I.7. Résultats des tests microbiologiques

L'évaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes et des tanins a été réalisée par la technique de diffusion en utilisant le milieu gélosé solide (Muller Hinton). L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à la température adéquate pour le développement du germe. Lors de cette étude, l'action de deux extraits flavonoïdique et tanniques de la plante vis-à-vis des quatre souches bactériennes sont testés. Les résultats de l'évaluation antibactérienne des extraits sont représentés sur la figure ci-dessous (**fig.18**).

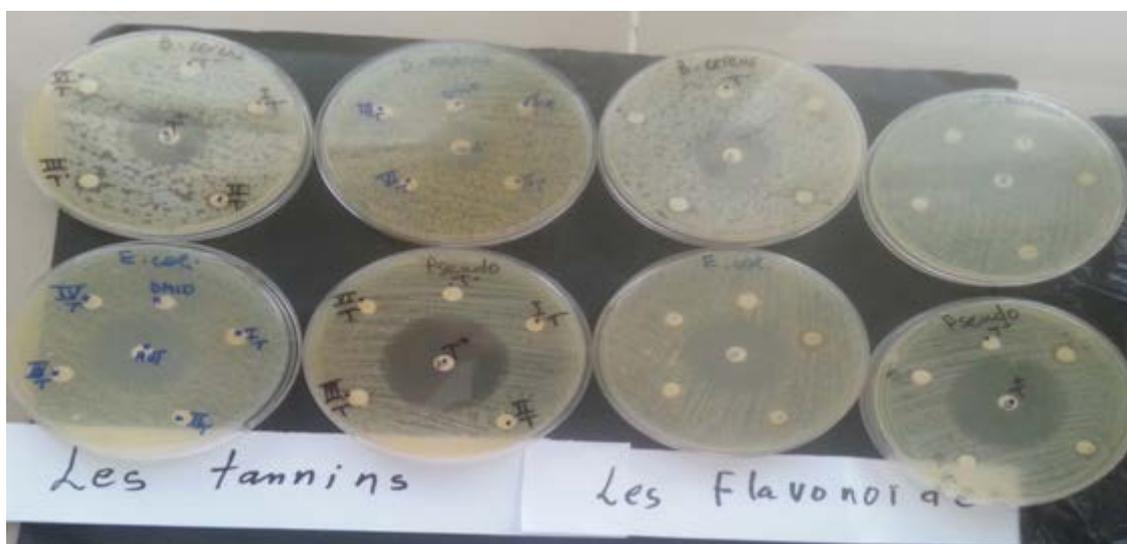


Fig. 18 : Exemples de l'activité antibactérienne des extraits testés.

Tableau 07 : Activité antibactérienne de l'extrait tannique sur milieu Mueller-Hinton.

Souches bactérienne testées	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)					
	Tan	Tan 1/2	Tan 1/4	Tan1/8	DMSO	Témoins positifs
Escherichia coli	00,00	00,00	00,00	00,00	00,00	35,00
Staphylococcus aureus	00,00	00,00	00,00	00,00	00,00	27,00
Pseudomonas aeruginosa	00,00	00,00	00,00	00,00	00,00	40,00
Bacillus cereus	07,00	08,00	07,00	09,00	00,00	25,00

Le tableau 07 montre une faible activité de l'extrait tannique ainsi ces différentes dilutions vis-à-vis la souche bactérienne *Bacillus cereus* dont les diamètres des zones d'inhibition sont 7, 8, 7 et 9 mm.

Les trois souches bactériennes *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* semblent être non sensible ou résistante vis-à-vis l'extrait tannique et les extraits dilués 1/2, 1/4, 1/8.

Tableau 08 : Activité antibactérienne de l'extrait flavonoïdique sur milieu Mueller-Hinton

Souches bactérienne testées	Diamètres des zones d'inhibition en mm					
	Flv	Flv ½	Flv1/4	Flv1/8	DMSO	Témoins positifs
Escherichia coli	10,00	09,00	08,00	00,00	00,00	29,00
Staphylococcus aureus	09,00	10,00	09,00	07,00	00,00	20,00
Pseudomonas aeruginosa	11,00	08,00	00,00	00,00	00,00	30,00
Bacillus cereus	12,00	10,00	09,00	07,00	00,00	26,00

L'extrait flavonoïdique s'est révélé actif envers toutes les souches bactériennes testées mais avec des degrés différents. Le tableau 08 montre que la solution mère a une faible activité vis-à-vis les souches *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*.

Les extraits dilués (1/2,1/4,1/8) montrent une activité faible vis-à-vis les quatre souches utilisés dont les diamètres des zones d'inhibition sont varient entre 7 à 10 mm.

Ceci nous ramène à conclure que l'activité antibactérienne dépend de la concentration des extraits, plus ou moins importante selon la nature de la souche et le milieu de culture utilisée, la méthode utilisée influe aussi les résultats [50]. Elle dépend également de la répartition géographique de la plante, la nature de sol et la période de récolte.

Le témoin DMSO n'a exercé aucune activité inhibitrice, les colonies se développe normalement en sa présence, donc c'est un bon diluant pour ces extraits.

Une activité antibactérienne est connue pour les flavonoïdes. En effet, ils sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Escherichia coli* [51].

I.8. Résultat de l'activité antioxydante

I.8.1. Piégeage du radical libre DPPH· (2.2-diphényl-1-picryldrazyl)

Les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH· par l'extrait tannique sont portés sur les (fig. 19, 20,21).

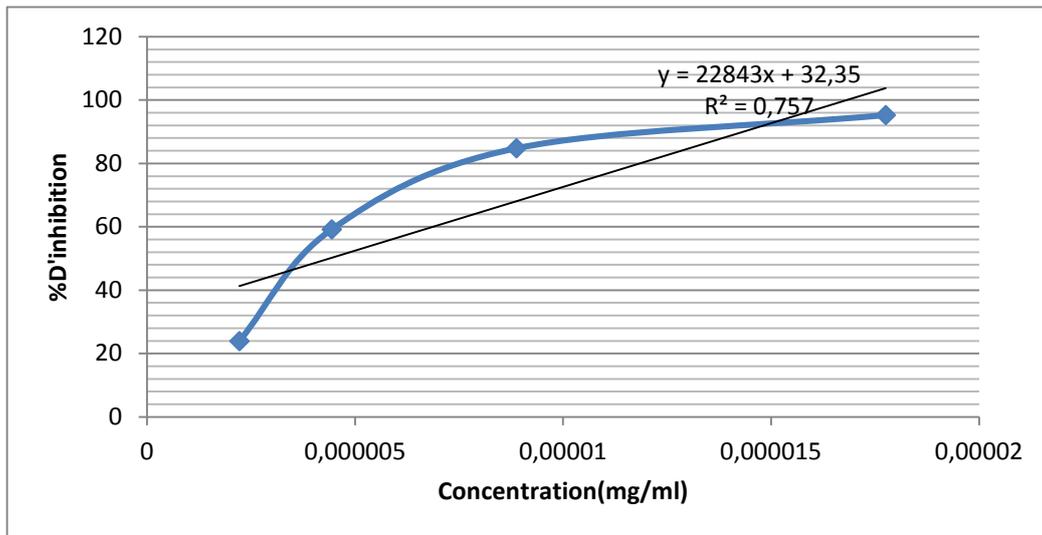


Fig. 19 : Pourcentage d'inhibition de DPPH· Par l'acide ascorbique.

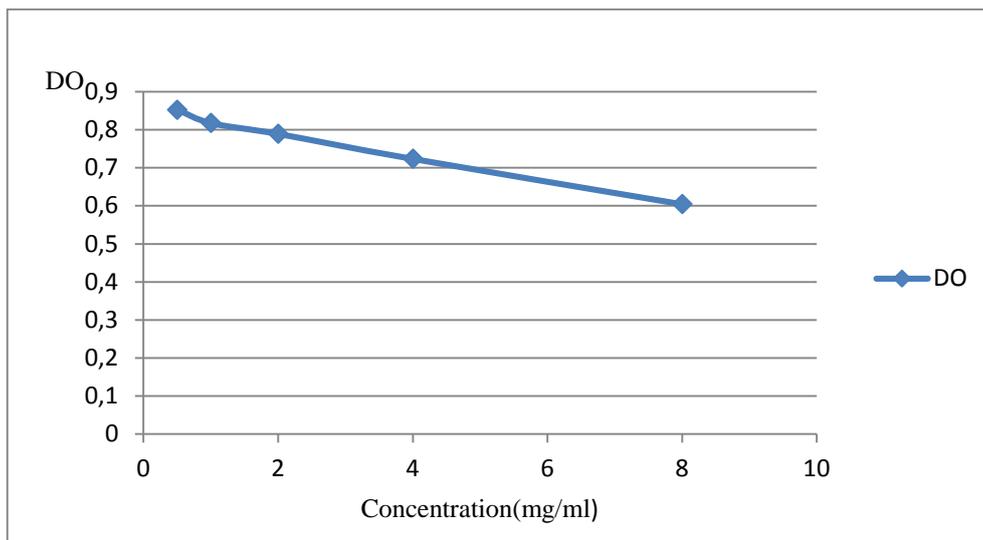


Fig. 20 : Densité optique en fonction de la concentration de composé tanins.

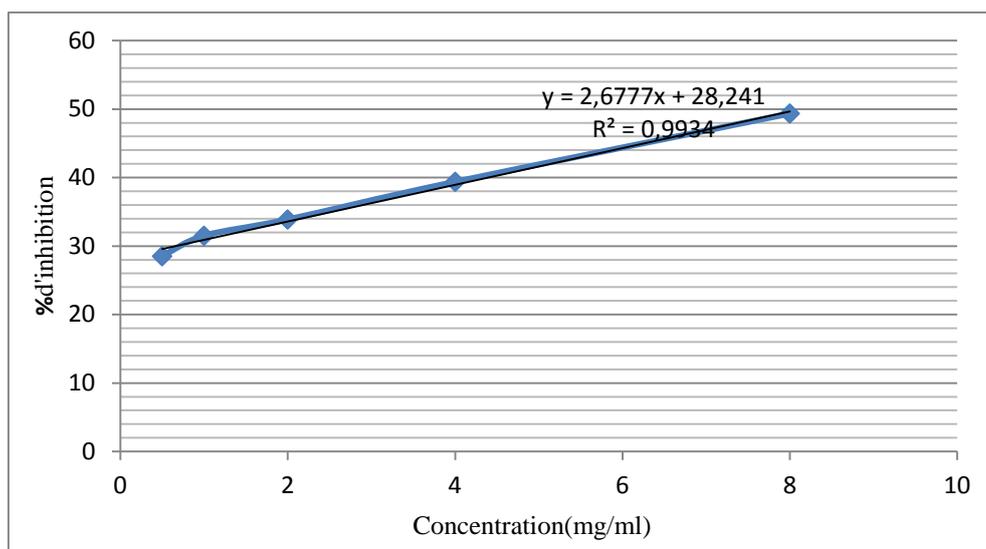


Fig. 21 : Pourcentage d'inhibition de DPPH \cdot par les tanins de Marrubium vulgare.

D'après ces résultats, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration. Le taux d'inhibition du DPPH \cdot enregistré en présence de l'extrait tannique est inférieur à celui de l'acide ascorbique.

Evaluation de l'IC₅₀

IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée [52].

La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH \cdot radicalaire, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extrait préparé.

D'après le calcul des valeurs IC₅₀ :

$$IC_{50_{\text{tanins}}} = 8,12 \text{ mg/ml}$$

$$IC_{50_{\text{acide ascorbique}}} = 0,00077 \text{ mg/ml}$$

Nous remarquons que la valeur IC₅₀ de composé standard (acide ascorbique) est très basse à celle des tanins.

Conclusion

D'après les résultats obtenus, nous pouvons déduire que l'extrait tannique possède une activité antioxydante faible. D'après Djahra [6], le test DPPH montre que les tanins représentent les composés les moins efficaces dans l'élimination des radicaux libres par rapport aux flavonoïdes.

Conclusion générale

Conclusion générale

Notre travail a porté sur l'étude phytochimique des feuilles du marrube blanc (*Marrubium vulgare*), récoltée dans la région de REDJAOUNA, wilaya de TIZI OUZOU

A la lumière des résultats obtenus, nous avons conclu que la partie aérienne du marrube blanc *Marrubium vulgare*, est très riche en tanins, flavonoïdes et contient également des saponines, des terpénoïdes et des stéroïdes.

L'extraction des flavonoïdes et des tanins de feuilles de l'espèce *Marrubium vulgare* étudiée nous amène à dire qu'elles renferment en plus des flavonoïdes avec un rendement de 9.4%, des quantités assez importantes de tanins 19%.

La présence de ces composés a été confirmée par les méthodes de chromatographie sur couche mince (CCM) et chromatographie liquide à haute performance (HPLC) réalisées sur les différents extraits.

Les profils HPLC des différents chromatogrammes ont révélé la présence de nombreux métabolites avec des temps de rétention très variables dont les pics majoritaires sont au nombre de trois pour l'extrait tannique et deux pour l'extrait flavonoïdique.

Ces principes actifs majeurs, les flavonoïdes et les tanins de la plante étudiée *Marrubium vulgare* possèdent une faible activité antibactérienne. Notre étude nous ramène à conclure que l'activité antibactérienne dépend de la concentration des extraits, plus ou moins importante selon la nature de la souche et le milieu de culture utilisé. Les flavonoïdes semblent plus efficaces que les tanins vis à vis des bactéries utilisées.

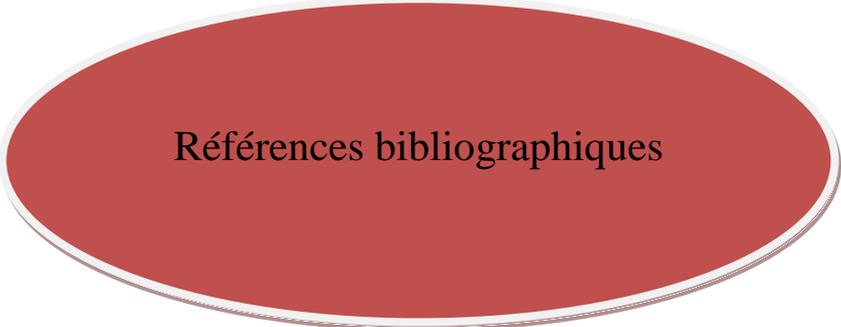
L'étude de l'activité antioxydante des tanins extraits de *Marrubium vulgare* par la méthode de réduction du radical libre DPPH a révélé que ces derniers possèdent une faible activité antioxydante avec une $IC_{50} = 8,12$ mg/ml

Ce travail va nous ouvrir des horizons de recherche ciblés dans le domaine des plantes utilisées en médecine traditionnelle, notamment en termes de mise en évidence des principes actifs et évaluation de leurs activités biologiques.

Sachant que notre plante étudiée *Marrubium vulgare* possède une biodiversité immense, se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par des recherches plus approfondies. A cet effet, il est important de :

- ❖ Réétudier son activité antioxydante et antibactérienne ;
- ❖ Etudier son activité anti-inflammatoire ;

- ❖ Développer des médicaments à base de cette plante ;
- ❖ Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires qui seront nécessaires et devront pouvoir confirmer ses effets thérapeutiques.

A red oval with a white border, centered on the page.

Références bibliographiques

1. Marles R.J, Farnsworth N. 1996. Antidiabetic plants and their active constituents : an update. *Protocols Journal of Botany and Medecine*, 1, 85-135.
2. Azzi R. 2013 contribution à l'étude de plantes médicinales utilisée dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algerien : enquête ethno pharmacologique : Analyse pharmaco-toxicologique de figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) Chez le rat Wistar : Thèse doctorat en biochimie : département biologie Faculté SNV STU, Université Tlemcen(Algérie).
3. Zaabt N., Darbour N., Bayet C., Michalet S., Doléans-Jordheim A., Chekir-Ghedira L., Akkal S.,Dijoux-franca M-G. 2010.Etude préliminaire de *Marrubium deserti* de Noé, une lamiaceae endémique algérienne. *pharmacognosie*, 8, 353-358.
4. Bouterfas K., Mehdadi Z., Latreche A., Aouad L. 2014. pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. en provenance du mont de tessala (Algérie occidentale). *pharmacognosie*, 12, 6-14.
5. Lhoste J. 1989. *Le grand livre de la phytothérapie*. Editions conseil +.
6. DJAHRA A B. 2013 Etude photochimique et activité antimicrobienne, antioxydant, anti hépatotoxique du marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. thèse : Doctorat : Université Badji Mokhtar, Annaba
7. Quezel F., Santa S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Ed. CNRS, Paris-France, 12, 801-802.
8. GFMER ; Geneva Foundation for Medical education Education and Research ; http://www.gfmer.ch/TMCAM/Atlas_medicinal_plants/Marrubium_vulgar.htm; consultation September 2010
9. Al kadi A.A. 1989. usage de quelques plantes dans la médecine populaire en Libbie, vol I, 2.
10. Novak I. ; Buzas G. ; Minker E. ; Kolfai M. et Szendrei K. 1966. *planta médicinale*, 14, 57.
11. Bellakhdar J. 1997 *Médecine Arabe Ancienne Et Savoirs Populaires La pharmacopée marocaine traditionnelle*, ibis press.
12. P.F. 2004. *Schauenberg. Guide des plantes médicinales*, 382.
13. J.C. 2004. *Houdret. Bien se soigner par les plantes*, 297.
14. Baba aissa F. 1999. *Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algérie*, Ed. Librairie moderne- Ruiba. p. 46-47-194-195-231.
15. Bonnier G. 1909. *La Végétation de la France, Flore Complète. Tome 09* Ed . Suisse et Belgique. Paris. pp. 25-26.

16. Dellile, L. (2007). Les plantes médicinales d'Algérie.
17. Masoodi M. H., Ahmed B., Zargar I. M., Khan S. A., Khan S. and Singh P. 2008. Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *African J Biotechnol*, 7: 86-87.
18. Çitoglu, G.S., Aksit, F. (2002). Occurrence of marrubiin and ladanein in *Marrubium Trachyticum* Boiss. From Turkey. *Biochem Syst Ecol*, 30, 885-886.
19. Nawwar, M.A.M., El- Mousallamy, A.M.D., Barakat, H.H., Buddrus, J., Linscheid, M. (1989). Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, 28, 3201-3206.
20. Papoutis, Z., Kassi, E., Mitakou, S., Aligiannis, N., Tsiapara, A., Chrousos, G.P. (2006). Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *J. Steroid Biochem Mol Biol*, 98, 63 -71.
21. Mann J., Davidson R.S., Hobbs J.B., Banthorpe D.V., Harborne J.B. (1994). *Natural Products: Their chemistry and biological significance*. 1ère Edition, Longman, England. pp.331-343.
22. Dixon, Robert M. W. 2000. A Typology of Causatives: Form, Syntax and Meaning. In Dixon, R.M.W. Dixon and Aikhenvald, Alexandra Y. (eds.), *Changing Valency: Case Studies in Transitivity*, 30-83. Cambridge: Cambridge University Press
23. Krief, S. (2003). *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal*, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p.
24. Fleuriet, A. (1982). Thèse Doc. Etat, Montpellier.
25. WAKSMUNDZKA-HAJNOS M. and SHERMA J., 2011 - High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical science. *Chromatographic Science Series*, 102 : 477-478.
26. DAI J. and MUMPER R J., 2010 - Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Propreties. *Molecules*, 15(10) : 7313-52.
27. MACHEIX J.J., FLEURIET A. et JAY-ALLEMAND C., 2005 - Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechnologiques et universitaires romandes, France, 192 p.
28. Manallah, A. (2012). *Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L : Pour obtenir le Diplôme de magister, Option : Biochimie Appliquée*. Université Ferhat Abbas- sétif, 87p.
29. Harborne J.B., Williams C.A. (2000). Advances in flavonoïde research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.

30. Skerget M., Kotnik P., Hadolin.M., Hras A.R., and SimonicM., Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chem*, 89, 191-198.
31. Dacosta Y. (2003). *Les phytonutriments bioactifs*. Ed Yves Dacosta. Paris. 317p.
32. Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales –*. 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494
33. Effendi L., Yajun Y. et al. (2008). Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylatedflavonols in *Escherichia coli* .*Metab.Eng*, 8, 172-181.
34. Medic–Saric M., Jasprica I., SmolicicBubaloA, and Momar A. (2003). Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids.*CroaticaChemicaActa*, 77, 361-366.
35. Paris M et Hurabielle. (1981). *Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1.* Ed Masson. Paris.pp: 102-103-104-107.
36. Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M. (2001). *Le préparateur en pharmacie dossier. 2èmeEd TEC&DOC.* Paris. pp275.
37. Khanbabae K and Ree T.R. (2001). Tannins: Classification and Définition. *Journal Royal Society of Chemistry*, 18, 641-649. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
38. Wilfred V., Ralph N. (2006). *Phenolic compound biochemistry* Ed Springer .USA. 24p.
39. Zhang, Wen Jing, b Lars Olof Björn. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants *Fitoterapia FITOTE-01795; No of Pages 12*
40. Zenk M.H., Juenger, M. (2007). Evolution and current status of the phytochemistry ofnitrogenous compound. *Phytochemistry Review*, 68, 2757 – 2772.
41. Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D. 2002. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic- electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography*, 967, 85-113.
42. Tieli, B. 1997. *L’herbier de santé. 1°édition.* Paris : édition VECCHI SAO, 01.206 p.
43. Harbone J.B. 1998. *Phytochemical Methods : A guide to moderne techniques of plant analysis.* 3e ed. chapman and hill. 303p
44. Wichtl M., Anton R. (2003). *Plantes thérapeutiques : traditions, pratiques officinale,science et thérapeutique.* 2eme éditionTec & Doc.

45. Amarowicz R., Troszynska A., Shahidi, F. (2005). Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. *J food lipids* , 12: 344-358.
46. Doughari et al. (2007). Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 80, 772 – 790778.
47. Nair R., Chanda S. 2005. Anticandidal activity of *Punica granatum* exhibited in differentsolvents. *Pharmaceutical Biology*, 43, 21-5.
48. Maataoui B. S., Hmyene A., Hilali S. 2006. Activites anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie. *Lebanese Science Journal*,7, 3-8
49. Mohammedi Z. 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et Flavonoids de quelques plantes de la region de tlemcen: Mémoire de magister.Tlemcen.
50. NATARAJAN D., JOHN BRITTO S., SRINIVASAN K., NAGAMURUGAN N., MOHANASUNDARI C. and PERUMAL G., 2005. - Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *J-Ethnopharmacol*, 102, 123-126.
51. ULANOWSKA K., TRACZYK A., KONOPA G. and WEGRZYM G. 2006. - Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch.Microbiol*, 184(5) , 271-8.
52. Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. 2001. Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Limited, ISBN: 185573-463X.
53. Sowunmi S., Ebewele R.O., Peters C.A.H., 2000. Differential scanning calorimetry of hydrolysed mangrove tannin, *Ed Polym Int Polymer International*. 49: 574-578.

A red oval button with a white border and a slight shadow, centered on a white background. The word "Glossaire" is written in black serif font in the center of the oval.

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).

Angiospermes : Plante à graines dont l'ovule, fécondé par l'intermédiaire d'un tube pollinique, se transforme en un fruit clos.

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.

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

Dicotylédones : Une plante **dicotylédone** est une plante angiosperme dont la graine dispose, comme son nom l'indique, de deux cotylédons.

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

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

Herbacées : Qui est de la nature de l'herbe. Se dit d'une plante non ligneuse (dont la tige n'a pas la consistance du bois), le terme de plantes **herbacées** désignant pour sa part des plantes non ligneuses dont la partie aérienne meurt après la fructification.

Mésophylle : constituant tout le limbe de la feuille, sauf les deux épidermes et les nervures.

Pétiole : partie de la feuille, généralement rétrécie, qui unit le limbe à la gaine chez les plantes dicotylédones. C'est la queue de la feuille.les feuilles sont pétiole sont dites sessiles.

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.

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.

Lexique des termes médicaux

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.

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.

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

La gastroentérite : inflammation des membranes (muqueuses) tapissant l'estomac et l'intestin. Elle se traduit par des nausées et/ou des vomissements, de la diarrhée, des douleurs abdominales et habituellement de la fièvre.

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.

A large, horizontally-oriented oval with a solid red fill and a thin white border, centered on the page.

ANNEXE

Annexe

Annexe 1 : Réactifs de caractérisation

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

- Dissoudre 1,2 g d'iode (I₂) 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 I₂ 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 HgCl₂ 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 FeCl₃ a 1% : Cette solution a été préparée comme suit :

- Dissoudre 1g de FeCl₃ dans 99 ml d'eau distillée.

Solution de KMnO₄ a 1% : Cette solution a été préparée comme suit :

- Dissoudre 1g de KMnO₄ dans 99 ml d'eau distillée.

Solution d'AlCl₃ a 2% :

- Dissoudre 1g d'AlCl₃ dans 99 ml de méthanol.

Annexe 2 :

- **Gélose Mueller-Hinton** : est une gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard. Cette gélose standardisée est la gélose permettant de tester l'action des antibiotiques sur les bactéries. Elle doit être coulée en boîte de façon à obtenir une épaisseur de 4 mm.

a) Composition

Infusion de viande de bœuf:.....300,0 ml

Peptone de caséine:.....17,5 g

Amidon de maïs:.....1,5 g

Agar:.....17,0 g

pH.....7,4

b) Préparation

38 g par litre. Stérilisation à l'autoclave. Pour préparer ce milieu il faut peser 38g de poudre et la mélanger dans 1l d'eau. Il faut homogénéiser puis chauffer en agitant. Il faut porter à ébullition pendant environ une minute. Ensuite il faut stériliser la gélose à l'autoclave durant 15 minutes à 116°C.

▪ Eau physiologique

Dissoudre 9 g de chlorure de sodium NaCl dans 1 litre d'eau distillée. Bien agiter.

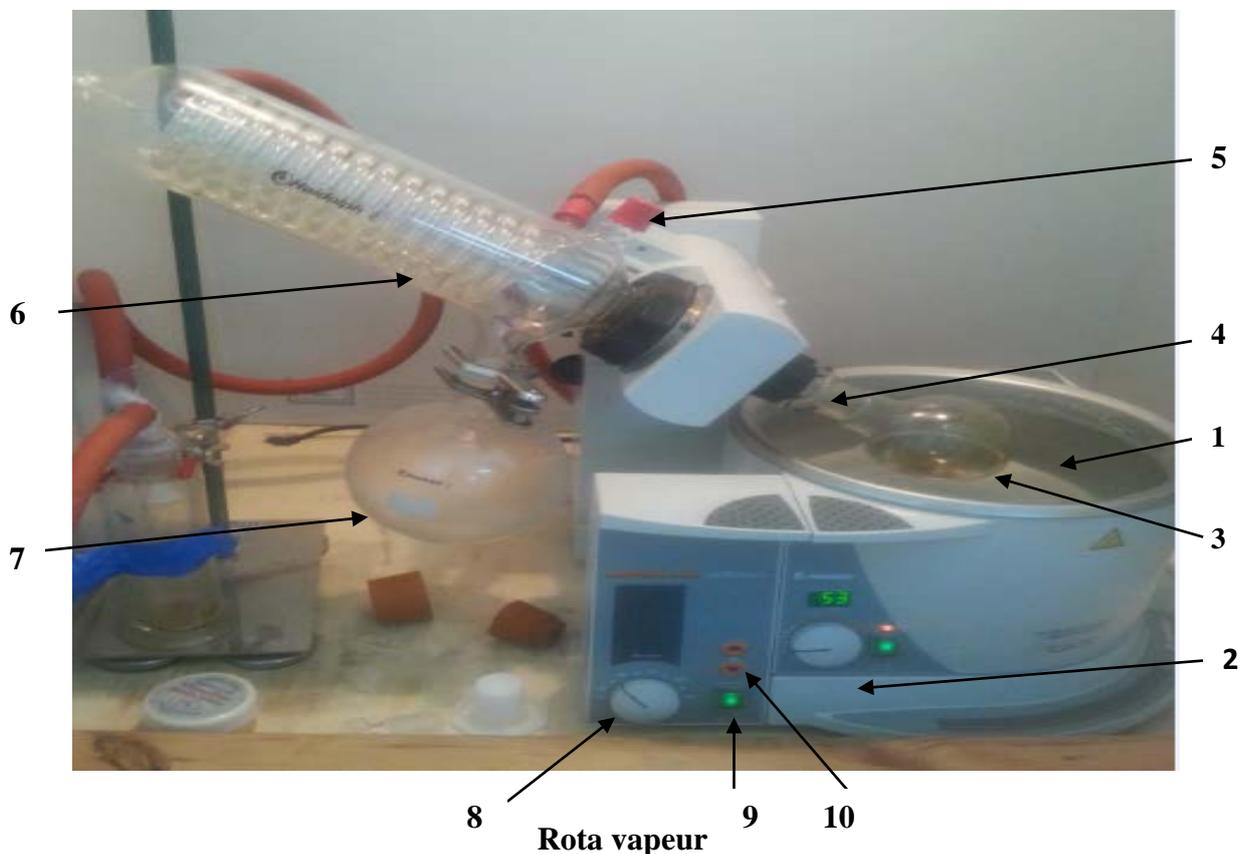
Autoclave à 118°C pendant 24 heures.

Solutions testées :

Diluer 340mg de l'extrait tannique et 656mg de l'extrait flavonoïdique dans 10 ml de DMSO (solution mère), des solutions à différentes concentrations ont été préparées à partir de la solution mère.

[C]mg/ml	1	1/2	1/4	1/8
[Tanins]	34	17	4,25	0,53
[Flavonoïdes]	65,6	32,8	8,2	1,02

Annexe 3: Liste des appareils utilisés



1. **Bain-marie d'eau distillée**
2. **Thermostat**
3. **Ballon contenant le solvant à extraire**
4. **Conduit de vapeur**
5. **Connexion à la trompe à eau : notice trompe à eau**
6. **Réfrigérant**
7. **Ballon récepteur du solvant extrait**
8. **Botton d'agitation**
9. **On /off**
10. **Down /up**



Spectrophotomètre UV-VIS [thermo scientific]



HPLC [SHIMADZU LC20]

Annexe 4 :

Solution de DPPH : Cette solution est préparée comme suit :

- Dissoudre 40 µg de DPPH dans 100 ml de DMSO.

Solution du blanc :

- Mélanger 2 ml de la solution de DPPH et 40 µl de la solution de DMSO.

Solutions testées :

Diluer 8 mg de l'extrait tannique dans 1 ml de DMSO (solution mère), des solutions à différentes concentrations ont été préparées à partir de la solution mère.

[C]mg/ml	8	4	1	0.125	0.0781
Absorbance à 517 nm	0.6043	0.7234	0.7889	0.8174	0.8525

Résumé

Ce travail porte sur un screening phytochimiques des différents extraits et une recherche d'effet antibactérien des extraits flavonoïdique et tannique et d'effet antioxydant de l'extrait tannique de la partie aérienne de marrube blanc (*Marrubium vulgare*), récolté dans la région de REDJAOUNA wilaya de TIZI OUZOU.

Le marrube blanc (*Marrubium vulgare* L), famille des Lamiacées, est une plante herbacée vivace, spontanée très répandue dans la région méditerranéenne.

Les tests phytochimiques, sur les différents extraits de la partie aérienne de *Marrubium vulgare*, ont révélé qu'en plus de sa richesse en tanins et flavonoïdes, elle contient également des saponosides, des terpénoïdes et des stéroïdes.

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits flavonoïdique et tannique de la partie aérienne de *M. vulgare*, ont montré que cette plante présente un effet antibactérien très faible.

En outre, l'étude du pouvoir antiradicalaire de l'extrait tannique vis-à-vis du radical libre DPPH a révélé que ce dernier possède un effet antioxydant faible avec une $IC_{50} = 8,12$ mg/ml.

Mots clés : *Marrubium vulgare*, screening phytochimiques, effet antibactérien, Effet antioxydant.

Abstract

This work deals with a phytochemical screening of the various preparations and a search for antibacterial effect of the flavonoid and tannic extracts and antioxidant effect of the tannic extract of the aerial part of white horehound (*Marrubium vulgare*), harvested in the region of REDJAOUNA wilaya of TIZI OUZOU.

White horehound (*Marrubium vulgare*), Lamiaceae family, is a perennial herb spontaneous, very responded in the Mediterranean region.

the phytochemical tests on the different preparations of the aerial part of maribium vulgare, revealed that in addition to its richness in tannins and flavonoids, it also contains saponosides, terpenoids and steroids.

The study of the antibacterial activity of the flavonoic and tannic extracts of the aerial part of *M. vulgare*, prepared, showed that this plant had a very low antibacterial effect.

In addition, the study of the antiradical power of the tannic extracts with respect to the free radical DPPH revealed that the latter had a low antioxidant effect with an $IC_{50} = 8.12$ mg.

Keywords: *Marrubium vulgare*, phytochemical screening, antibacterial effect, Antioxidant effect.