



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de Biochimie et Biologie cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Générale

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Évaluation phytochimique et évaluation du potentiel antibactérien des extraits d'une plante médicinale : *Marrubium vulgare*

Présenté par : Lemberbeche Hadjer

Le :

Rassouli Meriem Yasmine

Jury d'évaluation :

Président : Dr. Teniou S. (MCB – U Constantine 1, Frères Mentouri).

Encadrant : Dr. Demmak R.G (MCA – U Constantine 3, Salah Boubnider).

Examineur : Dr. Boudersa. N (MAB – U Constantine 1, Frères Mentouri).

Année universitaire
2024 - 2025

Remerciements

Nous exprimons notre profonde gratitude à **Allah**, le Tout-Puissant, pour nous avoir accordé la santé, la force et la volonté nécessaires pour entreprendre et mener à bien ce mémoire.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements à Dr. Demmak Rym Gouta, Maître de conférences au Département de Médecine, Université Salah Boubnider – Constantine 3, pour la qualité de son encadrement, sa disponibilité, sa rigueur, sa patience et son accompagnement constant, malgré ses nombreuses responsabilités académiques et professionnelles.

Nous remercions également les membres du jury de notre mémoire de Master pour l'intérêt porté à notre travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à l'ensemble de nos enseignants, ainsi qu'à toutes les personnes, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire. Qu'elles trouvent ici l'expression de notre reconnaissance la plus sincère, même si leurs noms ne sont pas explicitement mentionnés.



Dédicaces

À Ma mère, Dilmi Ahlam, pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute constante et son soutien indéfectible.

**À mon père, Lembarbeche Mouhamed,
L'homme qui a tant sacrifié pour moi et qui mérite toute ma reconnaissance.**

À mon cher mari, Oussama, ma moitié, un homme de valeur, mon mentor, mon soutien et mon équilibre.

À tous les membres de ma famille Lembarbeche et de ma belle-famille Boudraa, je vous exprime toute ma gratitude.

À mes beaux-parents, Riad et Fouzia, et plus particulièrement à ma belle-mère Fouzia, pour sa générosité et sa gentillesse.

À mes chers frères : Ayoub et Dayaa,

Et à mes chères sœurs : Chayma et Khawla.

**Enfin, je remercie de tout cœur ma chère binôme Meriem Yasmine.
Merci pour ton esprit d'équipe, ton soutien dans les moments difficiles, les efforts partagés, et ta présence précieuse.**

Un grand merci également à Madame Demmak Rym pour son soutien.

Hadjer





Dédicaces

Je dédie ce travail, fruit de beaucoup d'efforts, de persévérance et de passion, à tous ceux qui ont cru en moi et m'ont soutenue dans ce parcours.

À mon cher père, Tewfik, pilier de ma vie, pour ses précieux conseils, sa sagesse et son amour inconditionnel.

À ma tendre mère, Safia, dont les prières, le courage et la douceur ont toujours été mon refuge et ma lumière.

À mes sœurs bien-aimées, Wafa et Rahma et à leurs époux respectifs, pour leur soutien moral, leurs encouragements constants et leur présence rassurante.

À mes frères, Abdou et Mehdi, mes alliés dans toutes les étapes de ma vie, merci pour votre bienveillance et vos mots réconfortants.

À ma nièce Roukaya et mes neveux Marouane et Abderrahmane, sources de joie et d'inspiration.

À mon cher époux, Zaki, mon partenaire de vie, pour sa patience, sa compréhension et son soutien sans faille. Ta présence à mes côtés a été un moteur essentiel dans cette réussite.

Et au final à ma chère binôme Hadjer, pour son sérieux, sa gentillesse, son esprit d'équipe, sans elle ce travail n'aurait pu être réalisé.

Sans oublier de remercier : Pr. Necib qui m'offre la chance de vivre cette expérience ;

dr. Demmak, dr. Nouadhri et à l'ensemble de nos enseignants qui m'ont été d'une grande aide.

À tous ceux et celles que je n'ai pu nommer mais qui ont contribué, de près ou de loin, à cette réussite : merci du fond du cœur.

Meriem Yasmine



Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I : Généralités sur les métabolites secondaires

1. Généralités sur les métabolites secondaires	2
1.1. Composés phénoliques	2
1.2. Classes de polyphénols	2
a. Acides phénoliques.....	3
b. Tannins	4
c. Flavonoïdes	5
1.3. Terpénoïdes.....	6

Chapitre II : Plante étudiée : *Marrubium vulgare*

1. Généralités sur la famille des Lamiacées	7
2. Description botanique	7
3. Ecologie et distribution géographique de <i>Marrubium vulgare</i>	10
4. Composition biochimique de <i>Marrubium vulgare</i>	11
4.1. Flavonoïdes	11
4.2. Les autres familles de métabolites secondaires	12
5. Usage traditionnel et pharmacologique de <i>Marrubium vulgare</i>	14

Chapitre III : Activités biologiques de l'espèce étudiée

1. Activité antioxydante	15
2. Activité anti-inflammatoire.....	15

3. Activité anti-diabétique	16
4. Activité antimicrobienne	16
5. Activité antiproliférative	16
6. Activité antihypertensive	17
7. Activité antipyrétique	17

Chapitre IV : Matériel et méthodes

1. Matériel	19
1.1. Matériel végétal	19
1.2. Réactifs chimiques et instrumentation	19
2. Méthodes.....	20
2.1. Extraction des métabolites secondaires.....	20
2.2. Screening phytochimique.....	24
a. Détection des polyphénols	24
b. Détection des tannins	25
c. Détection des flavonoïdes	25
d. Détection de mucilage	25
e. Détection des saponosides	26
2.3. Dosage des polyphénols totaux	26
a. Principe	26
b. Préparation des solutions	26
c. Chromatographie sur couche mince	27
2.4. Activité antibactérienne	29
a. Test de l'activité antibactérienne.....	30

Chapitre V : Résultats et discussion

1. Détermination du rendement d'extraction	32
2. Screening phytochimique.....	33

3. Dosages des phénols totaux	34
4. Chromatographie sur couche mince	36
5. Activité antibactérienne	37
Conclusion.....	42

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Listes des abréviations

C6 : cycle a six atomes

M. vulgare : *Marrubium Vulgare*

dm : décimètre

cm : centimètres

IC : Concentration inhibitrice

µg : microgrammes

ml : millilitres

Tnf a : cytokine pro inflammatoire

COx : Enzyme cyclooxygenase

mg/ kg : milligrams/ kilograms

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane

C₂H₅OH : Ethanol

CH₃OH : Méthanol

Mg : Magnésium

Na₂CO₃ : Bicarbonate de Sodium

FeCl₃ : Chlorure de Fer

C₅H₁₂O : Alcool isoamylique

CHCl₃ : Chloroforme

H₂SO₄ : Acide Sulfurique

C₂H₆OS : Diméthyle Sulfoxide

C₄H₈O₂ : Acétate d'éthyle

% : pourcentage

24h : vingt-quatre heures.

37 ° : trente-sept degrés Celsius.

FeCl₃ : Chlorure ferrique

HCl : Chlorure d'hydrogène

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

CPG : chromatographie en phase gazeuse

nm : nanomètres

CCM : chromatographie sur couche mince

H₂O : l'eau

EAG/g : équivalent d'acide gallique en gramme

Uv : ultraviolet

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

Liste des figures

Figure 1: Principaux polyphénols et leurs structures chimiques (Polverino de Laureto ; P. Palazzi L et Acquasaliente L, 2017)	3
Figure 2: Structure des tannins (Bennick, 2002).....	5
Figure 3: Structure des polyphénols	6
Figure 4: La plante <i>Marrubium vulgare</i> (Boullard, 2001)	8
Figure 5: Structure de quelques flavonoïdes isolés de <i>Marrubium vulgare</i> (Boudjelal et al., 2012; Amessis Ouchemoukh et al., 2014).....	11
Figure 6: Quelques structures des composés retrouvées chez <i>Marrubium vulgare</i> (Stulzer et al., 2006 ; Boudjelal et al., 2012 ; Amessis Ouchemoukh et al., 2014).....	12
Figure 7: Les maladies traitées par le marube blanc selon l'enquête ethnobotanique de Boutabia et al., 2020.	18
Figure 8: Matériel végétal broyé de <i>Marrubium vulgare</i>	19
Figure 9: Extraction des métabolites secondaires par des solvants à polarité croissante	22
Figure 10: Étapes de macération et de filtration des parties aériennes de la plante	23
Figure 11: Procédé de concentration de l'extrait (évaporateur rotatif)	23
Figure 12: Préparation des solutions mères.....	24
Figure 13: Schéma explicatif de la CCM	28
Figure 14: Représentation graphique des rendements d'extraction en (%) des extraits de <i>Marrubium vulgare</i>	33
Figure 15: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	34
Figure 16: Représentation graphique des teneurs en phénols totaux des extraits de <i>Marrubium vulgare</i>	35
Figure 17: Chromatographie sur couche mince à 254 nm.....	36
Figure 18: Chromatographie sur couche mince à 365nm.....	36
Figure 19: Chromatographie sur couche mince après utilisation du révélateur.....	37

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques des différentes parties de la plante	9
Tableau 2: Classification botanique de <i>Marrubium vulgare</i> (Chase et <i>al.</i> , 2009).....	10
Tableau 3: Effets biologiques des biomolécules de <i>Marrubium vulgare</i>	13
Tableau 4: Réactifs chimiques	20
Tableau 5: Le rendement d'extraction en (g) et en (%)	32
Tableau 6: Résultats du screening phytochimique	33
Tableau 7: Les CMI obtenus des différents extraits de <i>Marrubium vulgare</i>	38
Tableau 8: Résultats des CMI des trois souches bactériennes après 24h d'incubation à 37°	39

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales représentent une source précieuse de substances aux activités biologiques et pharmacologiques diversifiées. Ces composés, également appelés métabolites secondaires, jouent un rôle essentiel dans la recherche pharmacologique et le développement des médicaments. En effet, les constituants des plantes ne sont pas seulement utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais servent aussi de matières premières pour la synthèse de nouveaux traitements.

L'Algérie se distingue par une diversité floristique remarquable, composée en grande partie de plantes médicinales et aromatiques poussant naturellement. La mise en valeur de cette richesse végétale constitue un enjeu majeur pour le développement du pays (Amroune, 2018).

Marrubium vulgare, communément appelé marrube blanc, est une plante appartenant à la famille des lamiacées originaire d'Europe, d'Asie et d'Afrique du Nord, cette plante est largement répandue dans les zones tempérées et arides où elle pousse principalement sur des sols secs et rocailleux (Duke, 2002).

Le marrube blanc est utilisé en médecine traditionnelle pour traiter divers maux, notamment les affections respiratoires, digestives et hépatiques (Wichtl, 2004). De plus, il est employé en infusion ou en sirop pour soulager les troubles digestives tels que les ballonnements et l'indigestion (Barnes, et *al.*, 2007).

Le *Marrubium vulgare* contient plusieurs composés bioactifs, notamment des lactones diterpéniques, des flavonoïdes, des phénols qui lui confèrent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et cardioprotectrices (Akkol et *al.*, 2012).

Dans une optique de valorisation des plantes médicinales Algériennes, nous avons tracé les objectifs suivants :

- Extraire les métabolites secondaires de *Marrubium vulgare* ;
- Tester l'activité antibactérienne des extraits obtenus.

Notre travail est scindé en deux parties, la première partie est une étude théorique qui résume des données bibliographiques sur le *Marrubium vulgare* et ses métabolites secondaires, et la seconde partie est une étude pratique incluant matériel et méthodes d'analyses, les résultats obtenus et leur discussion.

Chapitre I

Les métabolites secondaires

1. Généralités sur les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont de petites molécules organiques dérivées de métabolites primaires produites naturellement dans les plantes ; leur masse moléculaire est généralement inférieure à 3000 Da (Twaij et Hasan, 2022).

La nature chimique et la composition de ces métabolites varient selon les espèces végétales. Ces composés sont intéressants pour diverses raisons, notamment en raison de leur diversité structurale et de leur potentiel en tant que candidats pour les médicaments ou antioxydants (Twaij et Hasan, 2022).

Les fonctions biologiques des métabolites secondaires étaient largement méconnues en raison de leurs faibles concentrations dans les plantes. Ils étaient autrefois considérés comme des déchets métaboliques ou des produits de détoxification. Les connaissances sur ces composés, connues autrefois pour leurs effets toxiques sur les cellules animales, se sont étendues au cours des quarante dernières années pour reconnaître leur importance écologique et de nombreux autres bienfaits (Twaij et Hasan, 2022).

1.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques, ou polyphénols, sont des molécules organiques présentes en abondance dans le règne végétal. Ils se caractérisent par la présence d'un noyau aromatique portant des groupes hydroxyles, libres ou liés à des glucides. Ces composés confèrent aux fleurs, fruits et légumes leurs diverses couleurs et jouent un rôle essentiel dans la protection des plantes contre les agressions environnementales. Les polyphénols possèdent également des propriétés bénéfiques pour la santé humaine, notamment des effets antioxydants, anti-inflammatoires et anticancéreux (Twaij et Hasan 2022).

1.2. Classes de polyphénols

En fonction de leur diversité structurale, les composés phénoliques sont classés en plusieurs catégories, selon la complexité de leur squelette de base, allant de structures simples en C6 à des formes hautement polymérisées. Ils sont ensuite différenciés par leur degré d'hydroxylation et d'oxydation, ainsi que par les types de liaisons qu'ils forment avec d'autres molécules telles que les glucides, les lipides ou les protéines (Macheix et *al.*, 2005).

Les composés phénoliques se répartissent principalement en trois grandes classes : les acides phénoliques, caractérisés par des structures de type C6-C1 ou C6-C3 ; les flavonoïdes, présentant un squelette de type C15 ; et les tannins, constitués de structures polymériques de formule générale (C15).

Ces classes suscitent un intérêt croissant en raison de leurs propriétés bioactives remarquables, notamment dans les secteurs agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique (Rejeb I, 2008).

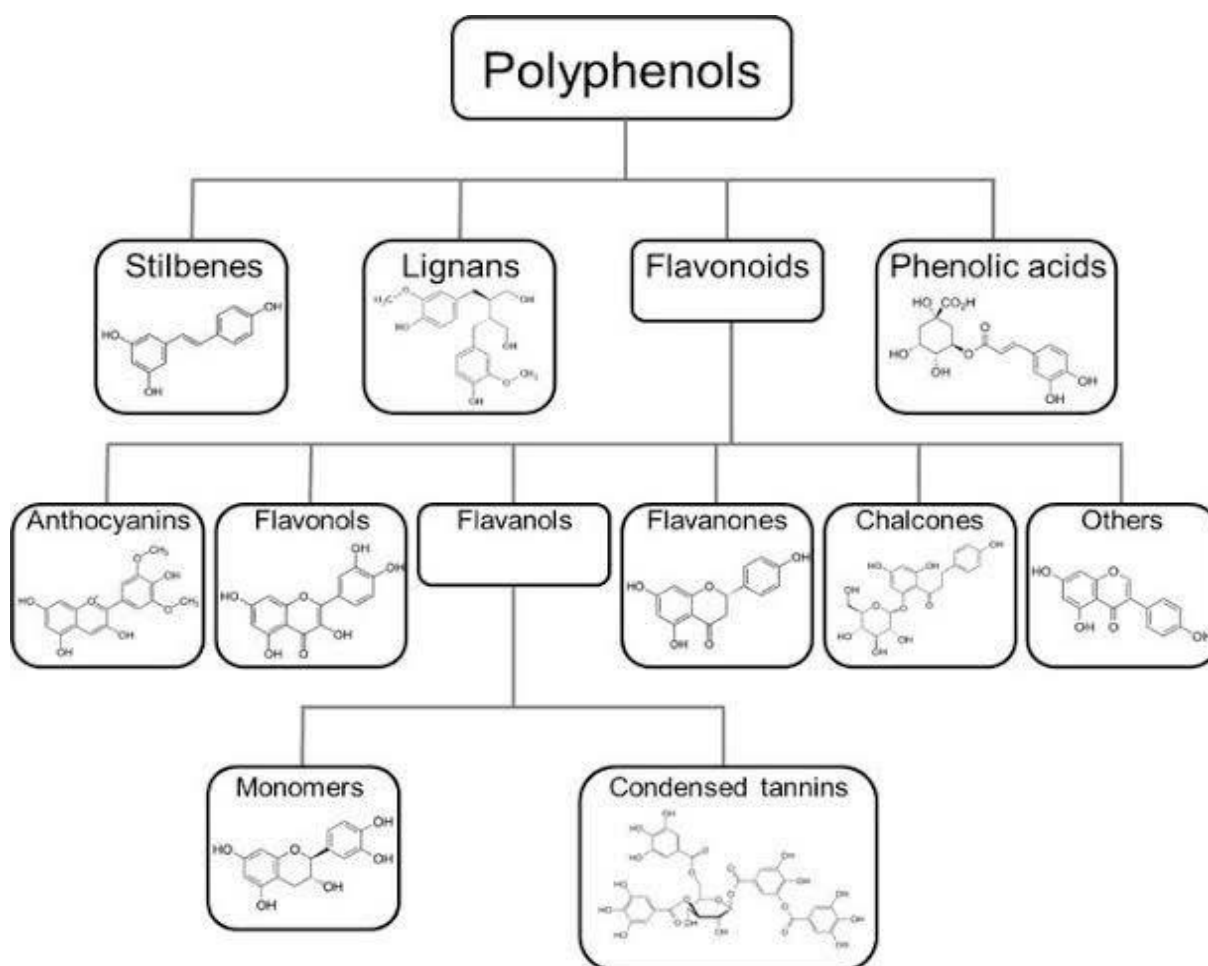


Figure 1: Principaux polyphénols et leurs structures chimiques (Polverino de Laureto ; P. Palazzi L et Acquasaliente L, 2017)

a. Acides phénoliques

Les acides phénoliques se divisent en deux sous-groupes principaux : les acides hydroxycinnamiques et les acides hydroxybenzoïques. Les acides hydroxycinnamiques, tels que l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide chlorogénique, sont largement répandus dans le règne végétal. Les acides hydroxybenzoïques, comme l'acide salicylique et l'acide gallique. Ces composés sont présents dans diverses plantes agricoles et médicinales (Shahidi et *al.*, 1992).

b. Tannins

Les tannins constituent un groupe complexe de polymères naturels, et il est difficile de leur attribuer une définition chimique précise. Le terme « tannin » était à l'origine utilisé pour désigner les composants végétaux responsables du tannage des peaux animales, processus au cours duquel ils forment des complexes stables avec le collagène de la peau. Ainsi, les tannins sont considérés comme des métabolites polyphénoliques des plantes, généralement de poids moléculaire supérieur à 500, capables de précipiter la gélatine et d'autres protéines en solution.

Il est important de noter que d'autres composés phénoliques peuvent se lier fortement aux protéines sans provoquer de précipitation. Selon leur structure, les tannins peuvent être divisés en deux groupes principaux : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Bennick, 2002).

- **Les tannins hydrolysables**

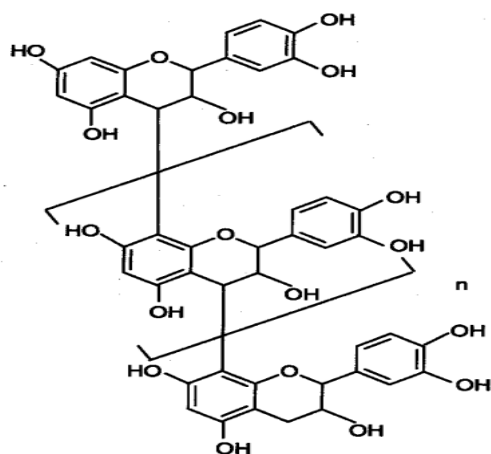
Ces tannins sont constitués d'un alcool polyhydrique, tel que le glucose, auquel sont liés l'acide gallique ou son dimère, l'acide hexahydrodiphénique, par des liaisons esters. Des variations structurales notables peuvent survenir par l'ajout de molécules d'acide gallique reliées de manière depsidique à d'autres unités galloyles.

Comme leur nom l'indique, ces composés sont facilement hydrolysés en milieu alcalin, libérant un alcool polyhydrique et de l'acide gallique dans le cas des gallotannins, ou de l'acide ellagique, produit de condensation de l'acide hexahydrodiphénique, dans le cas des ellagitannins. Un exemple de tannin hydrolysable est l'acide tannique pentagalloylglucose (Figure 2) (Bennick, 2002).

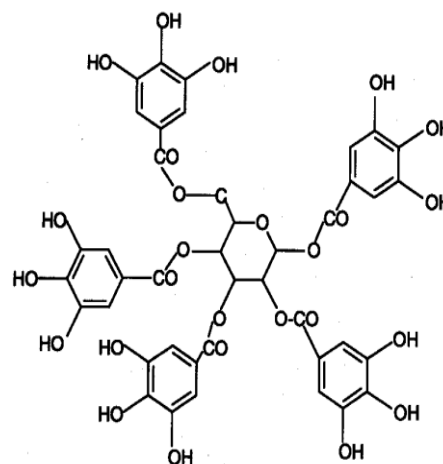
- **Les tannins condensés**

L'unité monomérique de ces tannins est un flavan-3-ol, comme la catéchine ou l'épicatéchine, reliée à d'autres unités par des liaisons carbone-carbone. Ils peuvent être dépolymérisés en milieu acide chaud, produisant des pigments anthocyanidines et d'autres produits. Ainsi, les proanthocyanidines constituent un autre nom pour les tannins condensés. Le degré de polymérisation varie considérablement, allant de quelques unités à plus de 50 molécules de flavanol, certains tannins condensés ont des poids moléculaires supérieurs à 30 000.

Tandis que les petites molécules de tannins condensés sont solubles dans des solvants aqueux ou organiques, les grands polymères sont insolubles, ce qui complique leur analyse, y compris la détermination de leur quantité dans les aliments d'origine végétale (Bennick, 2002).



Tannin condensé



Tannin hydrolysable

Figure 2: Structure des tannins (Bennick, 2002)

c. Flavonoïdes

On a recensé plus de 4 000 flavonoïdes, composés polyphénoliques largement distribués dans le règne végétal (Middleton and Kandaswami, 1994).

● Structure

Les flavonoïdes constituent la plus grande et la plus diversifiée des familles de polyphénols. Leur structure de base se compose de deux cycles aromatiques reliés par une chaîne de trois atomes de carbone, formant souvent un hétérocycle, comme illustré à la Figure 3B.

Cette diversité structurale est le résultat de variations dans la position, le nombre et la nature des substituants, donnant naissance à une multitude de flavonoïdes différents. Les flavones, des flavonoïdes dépourvus de groupe hydroxyle en position 3 (Figure 3C), et les flavonols, qui possèdent un groupe hydroxyle en position 3 (Figure 3D), sont parmi les flavonoïdes les plus courants.

Ces composés peuvent exister sous forme d'aglycones ou de glycosides. Par exemple, la quercétine, un flavonol majeur, est largement distribuée dans le règne végétal. Les flavan-3-ols, également appelés catéchines (Figure 3E), se trouvent souvent sous forme polymérisée, notamment en proanthocyanidines ou tannins condensés. L'épigallocatechine gallate, un dérivé de flavan-3-ol, est un composant majeur du thé (Figure 3F). Les flavonoïdes possèdent des propriétés antioxydantes et sont capables de neutraliser les radicaux libres.

Ces activités pourraient protéger les plantes contre les effets nocifs des rayonnements ultraviolets, ainsi que contre divers agents pathogènes tels que les insectes, les champignons, les virus et les bactéries (Bennick, 2002).

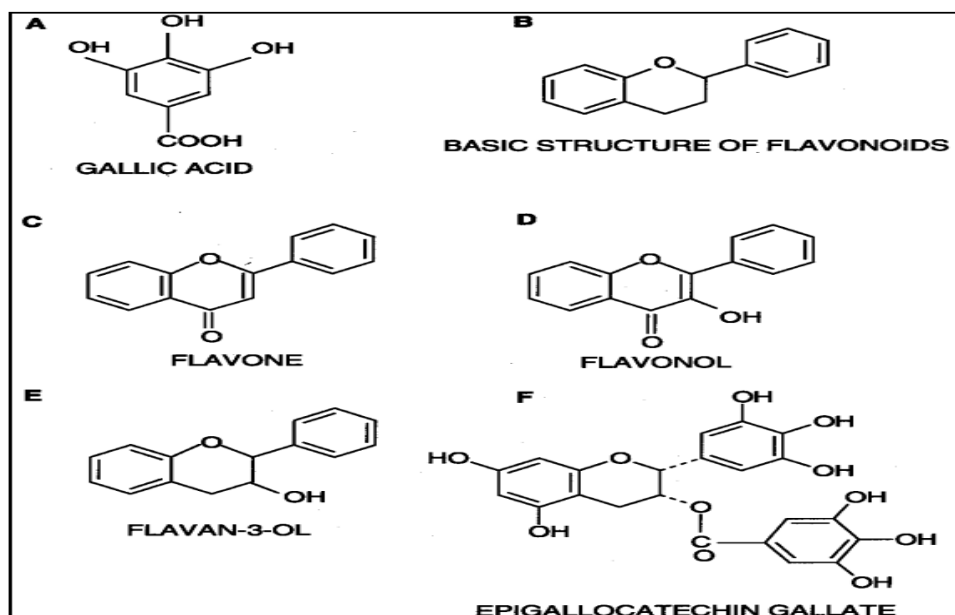


Figure 3: Structure des polyphénols

1.3 Terpénoïdes

Les terpénoïdes, également appelés isoprènes, sont des polymères dérivés d'unités d'isoprène à cinq atomes de carbone. Ils se classent en monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes et diterpénoïdes. Ces métabolites forment une vaste famille de composés organiques, avec plus de 35 000 structures identifiées, reflétant une grande diversité structurale. Les terpénoïdes possèdent diverses activités biologiques, notamment antituberculeuses, anticancéreuses, anxiolytiques et mutagènes (Twaij et Hasan, 2022).

Chapitre II

Plante étudiée :

Marrubium vulgare

1. Généralités sur la famille des Lamiacées

L'Algérie, située dans le bassin méditerranéen, possède une riche biodiversité florale d'intérêt aromatique et médicinal. Parmi les familles végétales les plus répandues, les Lamiacées, qui jouent un rôle important dans la flore Algérienne (Mohamed et Nada, 2019).

Aussi connues sous le nom de Labiées, les Lamiacées tirent leur appellation du mot latin « Labium » signifiant lèvre, en référence à la forme particulière de leurs corolles (Bouhaddouda et *al.*, 2016).

Les lamiacées, constituent une famille majeure de plantes angiospermes dicotylédones comprenant des espèces herbacées ou légèrement ligneuses appartenant à l'ordre des Lamiacées, ce sont des plantes à fleurs herbacées très parfumées (Abadi et Hassani, 2013).

Les plantes de cette famille possèdent plusieurs caractéristiques distinctives : (Mohamed et Nada, 2019).

- ✓ Une racine pivotante ramifiée ;
- ✓ Des tiges quadrangulaires, présentant quatre angles et quatre faces.

2. Description botanique

Marrubium vulgare est une plante herbacée vivace à l'aspect grisonnant, pouvant atteindre une hauteur de 25 à 60 cm et présentant une certaine ressemblance avec la menthe. Ses tiges, de section carrée, peuvent être simples ou ramifiées, droites ou légèrement couchées à la base, et recouvertes d'un duvet blanc cotonneux (Bouterfas et *al.*, 2013).

Ses feuilles opposées et pétiolées sont ovales à arrondies, duveteuses dentées de manière inégale, ridées et d'une teinte verte blanchâtre. La reproduction de cette plante est assurée par les insectes pollinisateurs (Bonnet, 2012). Le *Marrubium vulgare* fleurit d'Avril à Octobre (Kearney et Peebles, 1960).

Les fleurs, de petite taille (1,2 à 1,5 cm de longueur), sont blanches et regroupées en glomérules compacts espacés le long de la tige. La corolle est bilabée, avec une lèvre inférieure trilobe et une supérieure à deux lobes. Le calice est muni de dix dents courtes. La plante possède quatre étamines dissimulées dans le tube de la corolle.

Les fruits sont des akènes lisses et glabres, au nombre de quatre, riches à la base du calice

persistant, et arrivant à la maturité en automne. Concernant la partie souterraine, *M. vulgare* développe un rhizome robuste qui peut atteindre une hauteur de 6 à 8 dm (Schlempher et *al.*, 1996 ; Boullard, 2001).

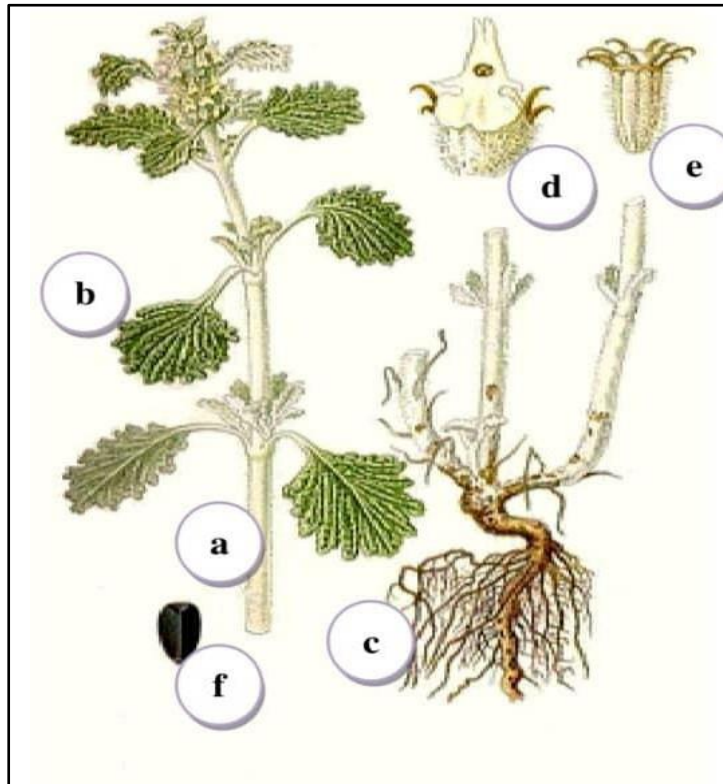







Figure 4: La plante *Marrubium vulgare* (Boullard, 2001)

a. Tige **b.** Feuille **c.** Racine (partie souterraine) **d.** Fleur **e.** Calice **f.** Grain

Les différentes caractéristiques de l'espèce *M. vulgare*, sont regroupées dans le Tableau 1.

Tableau 1: Caractéristiques des différentes parties de la plante

Partie de la plante	Description	Références
Racines 	<ul style="list-style-type: none"> - Racines pivotantes. - Fibreuses. - Peu profondes. - Couleur brunâtre. 	(Ozarowski et Glowacka, 2021)
Tiges 	<ul style="list-style-type: none"> - Pressés. - Quadrangulaires. - Ramifiées. - Hauteur de 30 à 80 cm. 	(Said et <i>al.</i> , 2016)
Feuilles 	<ul style="list-style-type: none"> - Opposées, pétiolées. - Ovales à arrondies. - Bord crénelé. - Face supérieure verte et ridée. - Face inférieure blanchâtre et laineuse. - Odeur aromatique. 	(Conforti et <i>al.</i> , 2008)
Fleurs 	<ul style="list-style-type: none"> - Groupées en verticilles axillaires. - Blanches à légèrement rosées. - Corolle bilobée. - Calice tubulaire à 10 dents épineuses. 	(Boulos, 1983)

Fruit 	- Tétrakènes - Dispersion par le vent et les animaux.	(Rahimmalek et <i>al.</i> , 2009)
---	--	-----------------------------------

➤ **Classification botanique**

Tableau 2: Classification botanique de *Marrubium vulgare* (Chase et *al.*, 2009)

Règne :	Plante
Sous règne :	Tracheobiontes
Embranchement :	Spermatophytes
Division :	Magnoliophytes
Classe :	Magnolipsides
Sous classe :	Astérides
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiacées
Genre :	Marrubium
Espèce :	Vulgare
Nom binomial :	<i>Marrubium vulgare</i>

3. Ecologie et distribution géographique de *Marrubium vulgare*

Le marrube blanc est largement répandu à travers l'Europe, en particulier dans les régions méditerranéennes. On le retrouve également au centre et au sud-ouest de l'Asie, ainsi qu'en Afrique du Nord, notamment en Algérie. Cette espèce est relativement commune sur l'ensemble du territoire, avec une forte présence au nord et une quasi absence au sud (Abadi et Hassani, 2013 ; Bouterfas et *al.*, 2014).

Le *Marrubium vulgare* se développe principalement dans des zones non cultivées, parmi les décombres, sur des terrains vagues, des prairies chaudes et sèches, ainsi que dans les garrigues, généralement sur des sols calcaires (Schlempher et *al.*, 1996).

4. Composition biochimique de *Marrubium vulgare*

4.1. Flavonoïdes

La majorité des flavonoïdes présents dans *Marrubium vulgare* sont extraits des feuilles en utilisant des solvants polaires tels que l'éthanol et le n-butanol. Ces composés comprennent principalement des hétérosides flavoniques et flavoniques notamment le quercétol, la lutéoline et l'apigénine; on y retrouve également des lactoylflavones, dérivés de l'acide ursolique (Nawwar et *al.*, 1989 ; Wolski et *al.*, 2007).

Des études menées par Al Khatib et *al.*, (2010), Pukalskas et *al.*, (2012) et Boudjelal et *al.*, (2012) ont permis d'isoler un nouveau flavonoïde à partir des sommités fleuries de *M. vulgare* appelé ladanéine. Ce composé a été identifié comme étant la 5,6 dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavone, et présente une activité anti-leucémique (Al Khatib et *al.*, 2010).

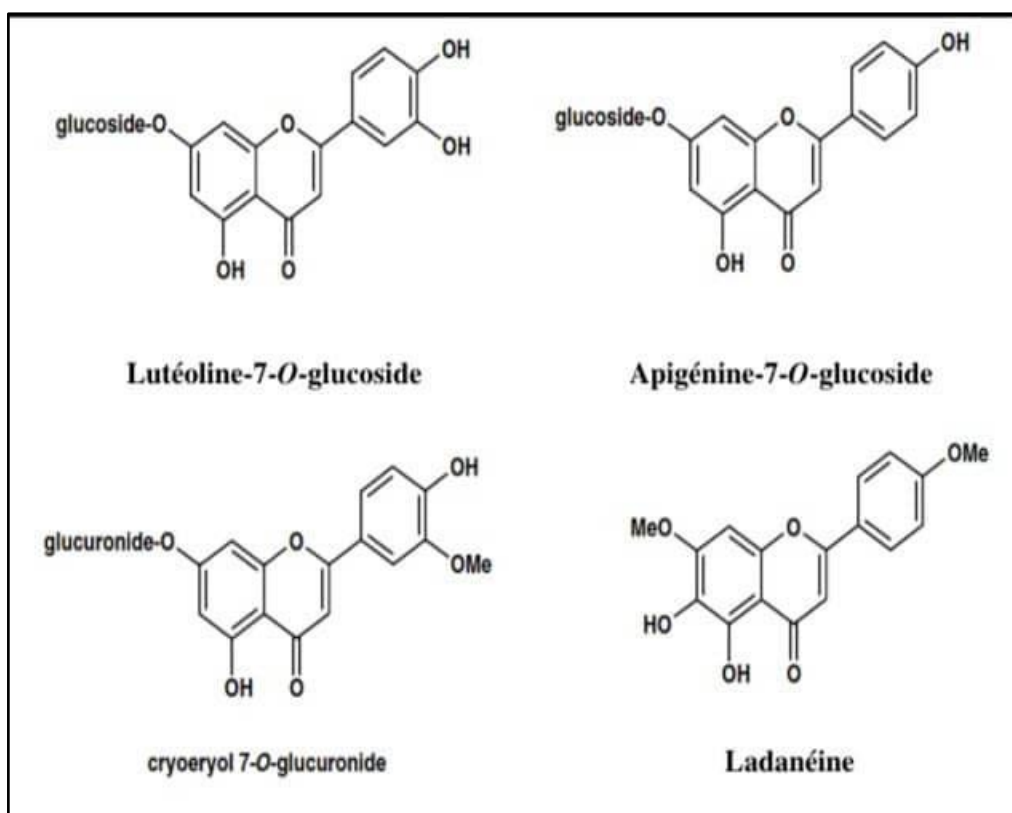


Figure 5: Structure de quelques flavonoïdes isolés de *Marrubium vulgare* (Boudjelal et *al.*, 2012; Amessis Ouchemoukh et *al.*, 2014)

4.2. Les autres familles de métabolites secondaires

Marrubium vulgare est riche en principe actif dont les principales structures moléculaires sont représentées dans la Figure 6.

➤ **Lactones diterpéniques labdaniques** : prémarrubiine, mareubiine, marrubénol, marrubiol, acide marrubique, marrulibacétal A, geshoidine et dextrétyl-forskoline (Stulzer et *al.*, 2006 ; Amessis Ouchemoukh et *al.*, 2014 ; Yousefi et *al.*, 2014).

➤ **Phénylpropanoïdes glycosides** : marruboside, verboscocide, forsythoside B, arémarioside et bollotétroside (Sahpaz et *al.*, 2002).

➤ **Tannins spécifiques** : dérivés de l'acide hydroxycinnamique, acide caféique, acide chlorogénique et acide p-coumarique (Wojdylo et *al.*, 2007).

➤ **Huiles essentielles** : limonène, sobinène, α pinène, comphène et para-cymène.

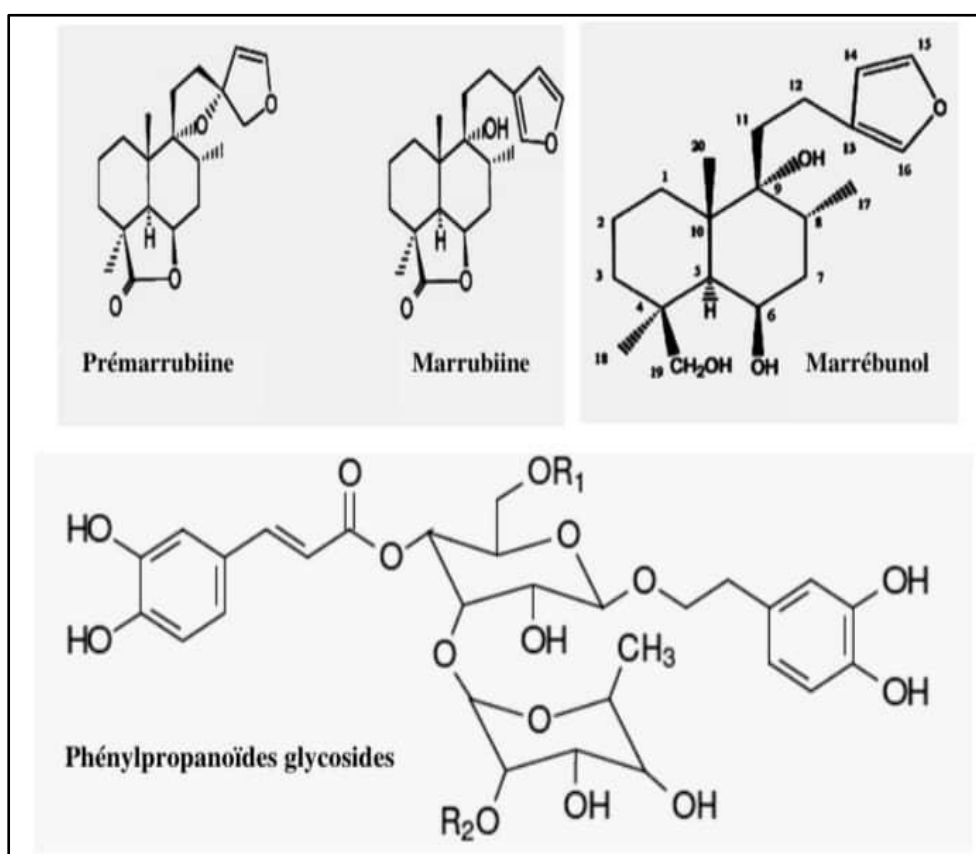


Figure 6: Quelques structures des composés retrouvées chez *Marrubium vulgare* (Stulzer et *al.*, 2006 ; Boudjelal et *al.*, 2012 ; Amessis Ouchemoukh et *al.*, 2014)

Certains travaux récents ont permis d'identifier les différents constituants actifs de *Marrubium vulgare* et leurs fonctions (Tableau 3).

Tableau 3: Effets biologiques des biomolécules de *Marrubium vulgare*

Biomolécules	Fonctions	Références
Flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> - Antioxydante. - Anti-inflammatoire. - Analgésique. - Antidiarrhéique. - Antibactérienne. 	(Elberry et <i>al.</i> , 2015 ; Yousefi et <i>al.</i> , 2014 ; Bouterfas et <i>al.</i> , 2016)
Diterpènes labdanes (marrubine, marrubénol)	<ul style="list-style-type: none"> - Antispasmodique. - Anti-inflammatoire. - Cholérétique. - Antihypertensive. 	(El Bardai et <i>al.</i> , 2004 ; Stulzer et <i>al.</i> , 2006 ; Yousefi et <i>al.</i> , 2014)
Acides phénoliques, phénylethanoides (marruboside)	<ul style="list-style-type: none"> - Antioxydante. - Anti-inflammatoire. - Antimicrobienne. - Anti-cancéreuse. 	(Berrougui et <i>al.</i> , 2006 ; Ahmed et <i>al.</i> , 2008 ; Xue et Yang, 2016)
Huiles essentielles (Eugénol)	<ul style="list-style-type: none"> - Antioxydantes. - Anticholinestérasique. - Antibactérienne. 	(Orhan et <i>al.</i> , 2010 ; Kadri et <i>al.</i> , 2011 ; Bokaeian et <i>al.</i> , 2014)

5. Usage traditionnel et pharmacologique de *Marrubium vulgare*

M. vulgare est une plante médicinale utilisée dans plusieurs pays pour traiter diverses affections, notamment les inflammations (dermatite, otite) et des troubles gastro-intestinaux comme l'ulcère (Balmé, 1982; Salinas et *al.*, 2005; Yousefi et *al.*, 2014), il est également recommandé pour ses propriétés antispasmodiques, insecticides et vermifuges, aidant ainsi à éliminer les parasites intestinaux (Newal et *al.*, 1996; De Souza et *al.*, 1998; Pavela, 2004; Stulzer et *al.*, 2006).

Marrubium vulgare est utilisée également dans le traitement des maladies neurodégénératives y compris la maladie d'Alzheimer par son effet inhibiteur sur la cholinestérase en augmentant la fonction cholinergique centrale (Orhan et *al.*, 2010). Le marrube blanc est surtout antitussif connu comme remède contre la toux, présent dans les sirops (par exemple Ricola®) et dans la préparation de thé, il est aussi antiseptique, son infusion est utilisée comme un lavage ou une préparation de pommade, le marrube est également utilisé pour désinfecter les plaies (Karryev et *al.*, 1976; Pukalskas et *al.*, 2012; Yousefi et *al.*, 2013; Bouterfas et *al.*, 2016).

Le *Marrubium vulgare* est aussi connu pour son rôle de stimulant digestif et de l'appétit, consommé en infusion froide, il agit comme un tonique amer, soulageant les états fébriles chez l'enfant, abaissant la fièvre et contribuant au traitement des affections hépatiques, notamment en stimulant la sécrétion biliaire (en exerçant une action cholérétique) (Ahmed et *al.*, 2008; Zaabat et *al.*, 2010). Son effet expectorant facilite l'élimination des sécrétions bronchiques, ce qui en fait un remède naturel contre les inflammations de la gorge et l'asthme grâce à ses mucilages aux propriétés anti-inflammatoires (Bouterfas et *al.*, 2016).

De plus, cette plante a été utilisée pour traiter l'ictère (jaunisse) et la fièvre typhoïde (Boullard, 2001). Elle est connue pour favoriser la perte de poids en accélérant le métabolisme lipidique, réduisant ainsi les triglycérides et le cholestérol. En Algérie, la décoction de *Marrubium vulgare* seule ou associée à d'autres plantes médicinales, est traditionnellement employée comme antidiabétique. Elle est également utilisée pour ses effets antihypertenseurs, anti-inflammatoires, antipyrétiques et antidiarrhéiques (Boudjelal et *al.*, 2012; Amessis Ouchemoukh et *al.*, 2014; Bouterfas et *al.*, 2016).

Selon Cocchini et Ticli (2008), cette plante est aussi un adjuvant de la cicatrisation des lésions, les Navajos donnaient aux mères une décoction des racines avant et après l'accouchement (Bremnes, 2005).

Chapitre III

Activités biologiques de l'espèce étudiée

1. Activité antioxydante

Le déséquilibre entre les processus homéostatiques des oxydants et des antioxydants dans l'organisme, causé par les radicaux libres, entraîne un stress oxydatif, ce stress est considéré comme la principale cause du vieillissement et il est impliqué dans de nombreuses maladies humaines, notamment le cancer, le diabète, les troubles neurodégénératifs, l'athérosclérose et l'ischémie cérébrale. Les antioxydants jouent un rôle clé en retardant, empêchant ou réduisant significativement les dommages oxydatifs causés aux molécules cibles (Lee et *al.*, 2020).

Les propriétés antioxydantes des extraits méthanoïques du *Marrubium vulgare* ont été déterminées en utilisant le test de piégeage des radicaux libres DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et les résultats ont révélé une forte activité avec une valeur de concentration inhibitrice (IC50) de 8,24-12,42 µg/ml (Keyvan et *al.*, 2016).

2. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est un ensemble de phénomènes réactionnels se produisant au point irrité par un agent pathogène, elle se traduit par quatre symptômes : la chaleur, la douleur, la rougeur et l'œdème. Des recherches ont révélé que les extraits de *M. vulgare* possèdent des effets protecteurs significatifs contre l'infarctus du myocarde induit par l'isoprotérénol, probablement en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires.

Par ailleurs, plusieurs composés issus de l'extrait méthanolique de *M. vulgare* tel que la 11-oxomarrubine, le vulgarcoside A et la 3-hydroxyapigénine-40-0-(600-0-p-coumaryl) B-d-glucopyronoside provenant de l'extrait méthanolique de *M. vulgare* ont montré des niveaux modérés à faible d'inhibition sur la cytokinine pro-inflammatoire TNFα (Shaheen et *al.*, 2014).

Les esters glycosidiques de phénylpropanoïdes de *M. vulgare* ont montré une activité inhibitrice de l'enzyme cyclooxygénase (COX) qui joue un rôle clé dans la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines (Sahpaz et *al.*, 2002).

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a montré que l'administration orale de l'extrait méthanolique de *M. vulgare* à la dose de 200 mg/kg chez des rats traités par la caraghénine entraîne une diminution (87,30%) de l'inflammation (Ghedadba et *al.*, 2016). Une étude *in vitro* de l'effet anti-inflammatoire de six composés de *M. vulgare* (luteoline 7-0- B glucopyranoside, apigénine-7-0- B glucopyranoside + acide oléonolique, B sitostérol, luteoline-7-0-rutinoside et acide rosmarinique) sur la COX ont montré que ses composés inhibent la

formation des hormones telles que les prostaglandines et la peroxasalandine, qui contribuent à la production d'intermédiaires inflammatoires (Shamil et *al.*, 2019).

3. Activité anti-diabétique

Marrubium vulgare est reconnu pour ses propriétés ethno-médicinales en tant qu'agent anti-diabétique (Hamza et *al.*, 2019). Des recherches ont été menées afin d'apporter des preuves scientifiques à son usage traditionnel dans le contrôle du diabète (Javier Rodriguez Villanueva et Villanueva, 2017).

Dans ce cadre, Hellal et *al.*, (2020) ont évalué *in vitro* l'activité inhibitrice de l' α glucosidase de six plantes médicinales Algériennes. Ils ont ainsi observé que les extraits éthanoliques à 801 de *M. vulgare* présentaient un effet modéré ($IC_{50}=12,66 \mu g/ml$). Par ailleurs, l'administration orale de son extrait aqueux a démontré des effets anti-diabétiques et anti-hyperlipidémiques significatifs, réduisant la glycémie de 50% à une dose de 100 mg/Kg (Boudjelal et *al.*, 2012).

De plus, Rhallab et *al.*, ont mis en évidence que l'administration répétée de *M.vulgare* entraîne une diminution significative du taux de glucose urinaire, de l'acide urique et de la créatinine sérique (Rhallab et *al.*, 2015).

4. Activité antimicrobienne

Le potentiel anti-microbien des différents extraits du *M. vulgare* (acétate d'éthyle, éther diéthylique et n-butanol) a été testé sur quatre souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus Vulgaris*, et *Pseudomonas aeruginosa*. L'extrait méthanolique de *M. vulgare* a montré une activité antimicrobienne importante contre *Echerichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus Vulgaris* et *Candidat albicans* (Kanyonga P.M et *al.*, 2011).

5. Activité antiproliférative

Marrubium vulgare est couramment utilisée en médecine traditionnelle pour traiter le cancer, bien que les mécanismes précis de son action et sa validité scientifique restent à approfondir (Bourhia et *al.*, 2019).

Zarai et *al.*, (2011) ont mis en évidence la capacité de l'huile essentielle de *M. vulgare* à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du col de l'utérus.

En outre, une autre étude a révélé que labdanum (un dérivé de la furoate de méthyle) présente un effet modéré sur les cellules de leucémie myéloïde (K562) ainsi que sur les cellules résistantes à l'imatinib (K562R) et sur les cellules progénitrices des lymphocytes B humaines (Al Khatib et *al.*, 2010).

M. vulgare semble donc agir par l'intermédiaire de plusieurs interactions avec des gènes cibles et des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose. Ces propriétés pourraient justifier son utilisation en complément du traitement du cancer (Shawky, 2019).

6. Activité antihypertensive

En 1976, Karryev M.O et *al.*, ont mis en évidence les propriétés vasodilatatrices du *Marrubium vulgare* à partir de son huile essentielle.

Plus récemment, El Bardai S et *al.*, ont concentré leur travail sur l'étude des propriétés anti-hypertensives du *Marrubium vulgare* et du *Foenicolom vulgare*.

7. Activité antipyrétique

Les recherches récentes sur l'effet de *Marrubium vulgare* contre la fièvre typhoïde ont révélé qu'elle possède la capacité de faire baisser la fièvre, tout en améliorant l'état général et en réduisant la durée de la maladie (Hameg et Taleb, 2018). Par ailleurs, la plante hachée est couramment appliquée en cataplasme sur le front et les tempes pour soulager la fièvre (Bellakhdar, 1997). De plus, son infusion chaude contribue efficacement à la diminution de la température corporelle (Bremnes, 2005).

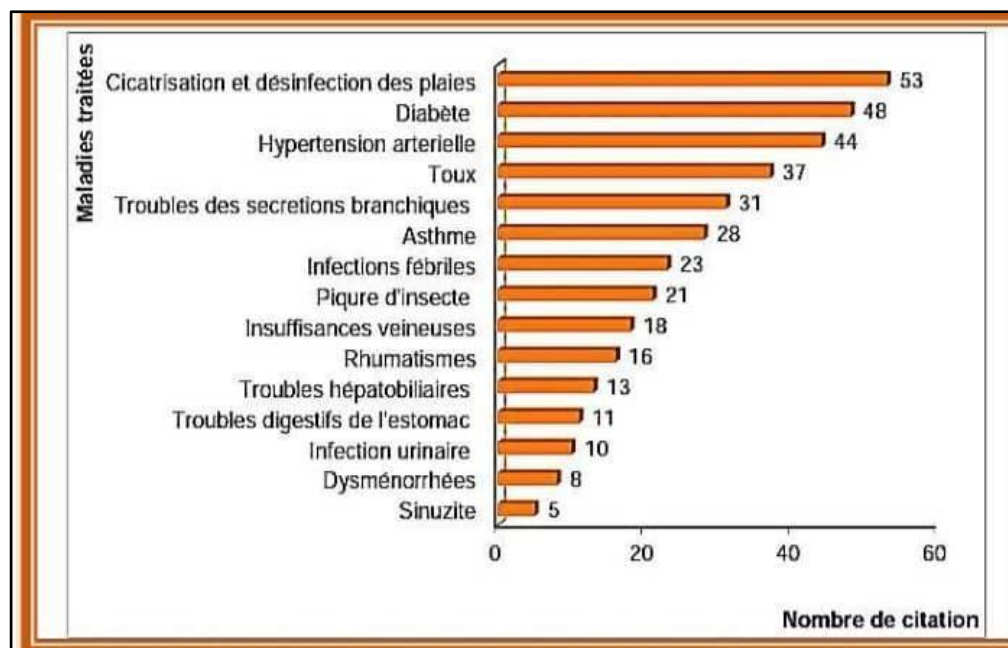


Figure 7: Les maladies traitées par le marrube blanc selon l'enquête ethnobotanique de Boutabia et *al.*, 2020.

Chapitre IV

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Les parties aériennes de l'espèce *Marrubium vulgare* ont été récoltées de la zone de AIN ABID (Wilaya de Constantine) le 15 Février 2025.

Le matériel végétal collecté a été séché à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules.

Après séchage, la partie à utiliser a été broyée grossièrement dans un moulin électrique au niveau du laboratoire de Biochimie Appliquée de Chaabet Ersass.



Figure 8: Matériel végétal broyé de *Marrubium vulgare*

1.2. Réactifs chimiques et instrumentation

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences (Tableau 4) :

Tableau 4: Réactifs chimiques

Produits	Formule brute
Dichlorométhane	CH_2Cl_2
Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
Méthanol	CH_3OH
Chlorure d'Hydrogène	HCl
Magnésium	Mg
Bicarbonate de Sodium	Na_2CO_3
Chlorure de Fer	FeCl_3
Alcool isoamylique	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$
Chloroforme	CHCl_3
Acide Sulfurique	H_2SO_4
Diméthyle Sulfoxide	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$
Acétate d'éthyle	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$
Folin-Ciocalteu	

➤ Appareillage :

- Evaporateur rotatif
- Micropipette
- Etuve
- Hotte
- Spectrophotomètre
- Balance de précision
- Bain-marie
- Agitateur

2. Méthodes

2.1. Extraction des métabolites secondaires

❖ Broyage

Les organes de la plante sélectionnée ont été broyés à l'aide d'un broyeur électrique afin d'obtenir une poudre qui a servi pour la préparation des extraits. Après broyage, la poudre a été

conservée dans des flacons ; puis, elle a été stockée soigneusement dans un endroit sec jusqu'à son utilisation.

❖ Principe

La macération est la technique d'extraction solide/liquide la plus simple, qui consiste à mettre en contact prolongé la poudre du matériel végétal avec un solvant avec ou sans agitation afin d'extraire les métabolites secondaires. Ce procédé se réalise à température ambiante, ce qui permet de préserver l'intégrité des molécules (Lagnika, 2005; Djabou, 2006).

❖ Protocole

Le protocole extractif a été effectué selon la méthode suivante :

Nous avons utilisé trois solvants à polarité croissante (Dichlorométhane, méthanol et éthanol /eau (50/50)) pour l'extraction des métabolites secondaires de l'espèce *Marrubium Vulgare* (Demmak et *al.*, 2021).

Une quantité de 43 g du matériel végétal broyé (tiges et feuilles) a été macérée dans 250 ml de dichlorométhane, pendant 24h à température ambiante. Le mélange est récupéré après filtration sur papier filtre Whatman n°3 dans un Erlenmeyer. La macération a été renouvelée sur le marc récupéré avec renouvellement des solvants de même mesure, pendant 24h, pour permettre la solubilisation et l'extraction des métabolites secondaires. Les deux macérats filtrés sont réunis pour donner l'extrait dichlorométhanologique brut.

Le même procédé a été réalisé avec les deux autres solvants : méthanol et éthanol/eau selon le schéma suivant :

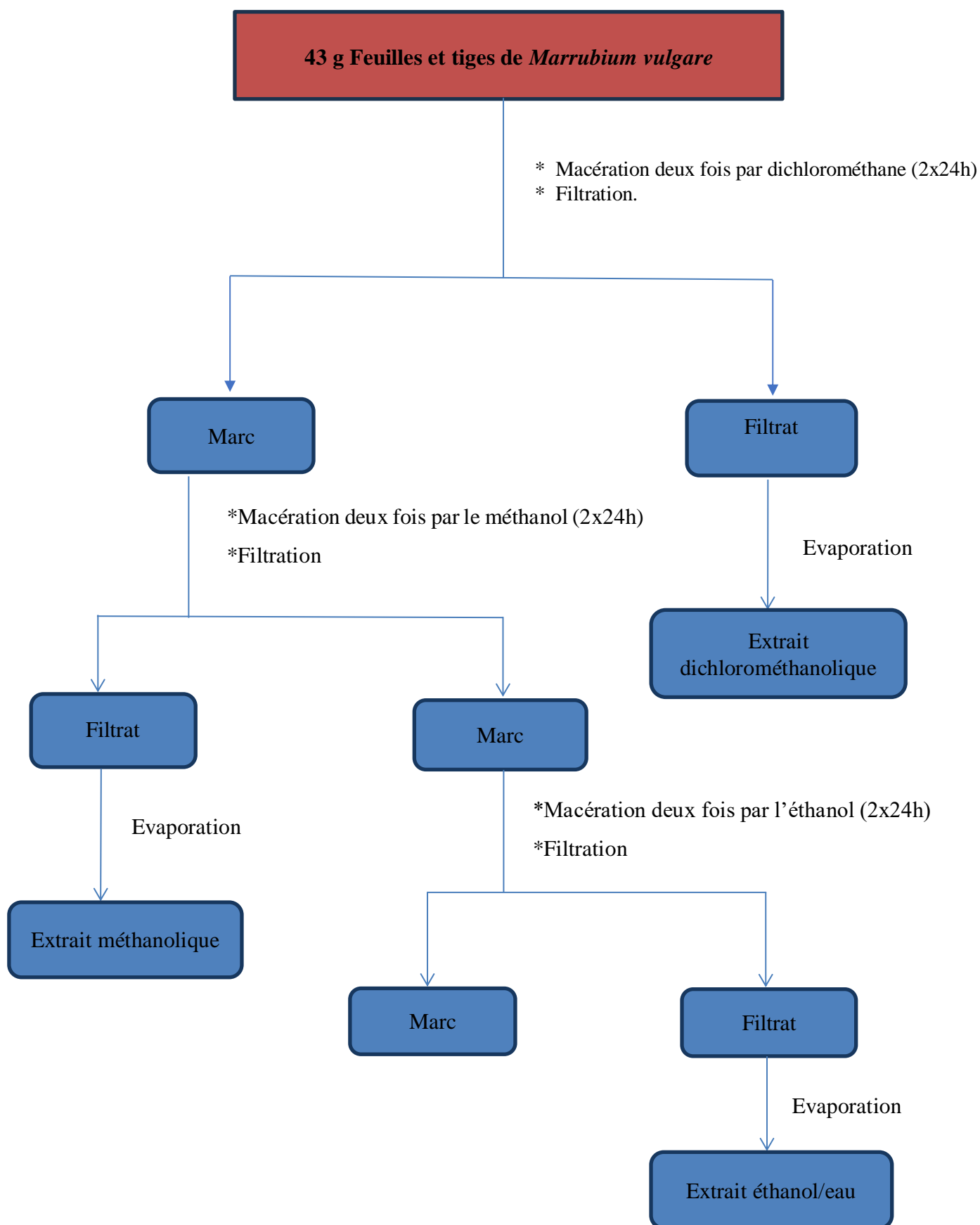


Figure 9: Extraction des métabolites secondaires par des solvants à polarité croissante

A l'abri de la lumière, l'ensemble des deux macérations a été filtré puis concentré à sec par un évaporateur rotatif donnant l'extrait du dichlorométhane, le marc issu de la filtration a subi une deuxième macération (2*24h) dans le méthanol donnant après évaporation à sec l'extrait méthanolique.

Enfin la dernière extraction a été réalisée selon le même protocole par le mélange solvant éthanol/eau, ce qui a permis d'obtenir un extrait hydroalcoolique.



Figure 10: Étapes de macération et de filtration des parties aériennes de la plante

L'extrait brut obtenu a été évaporé à sec sous pression réduite à 37° par un évaporateur rotatif (Figure 11).

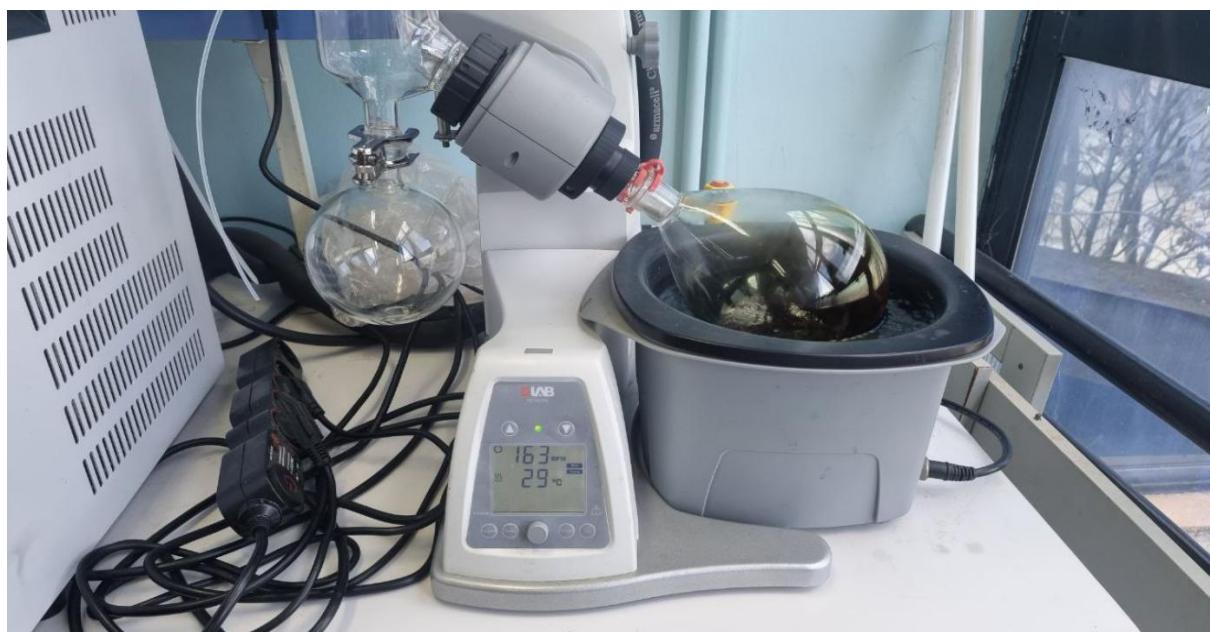


Figure 11: Procédé de concentration de l'extrait (évaporateur rotatif)

2.2. Screening phytochimique

Ce test de nature qualitative a été réalisé sur les trois extraits obtenus, il représente une étape préliminaire essentielle dans la recherche des molécules à potentiel thérapeutique. Le test repose sur des observations de solubilité, des réactions de coloration et des précipitations.

Cette analyse permet de mettre en évidence la présence de divers métabolites secondaires comme les polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponines, qui sont associés aux activités biologiques des plantes. Le dépistage a été effectué sur les trois extraits suivants :

❖ Préparation de la solution mère

Nous avons préparé trois tubes à essais :

TUBE 1 : 2,2 mg d'extrait méthanolique avec 2 ml de méthanol.

TUBE 2 : 1,7 mg d'extrait dichlorométhanique avec 2 ml de dichlorométhane.

TUBE 3 : 3,5 mg d'extrait éthanol/eau avec 2 ml de méthanol.

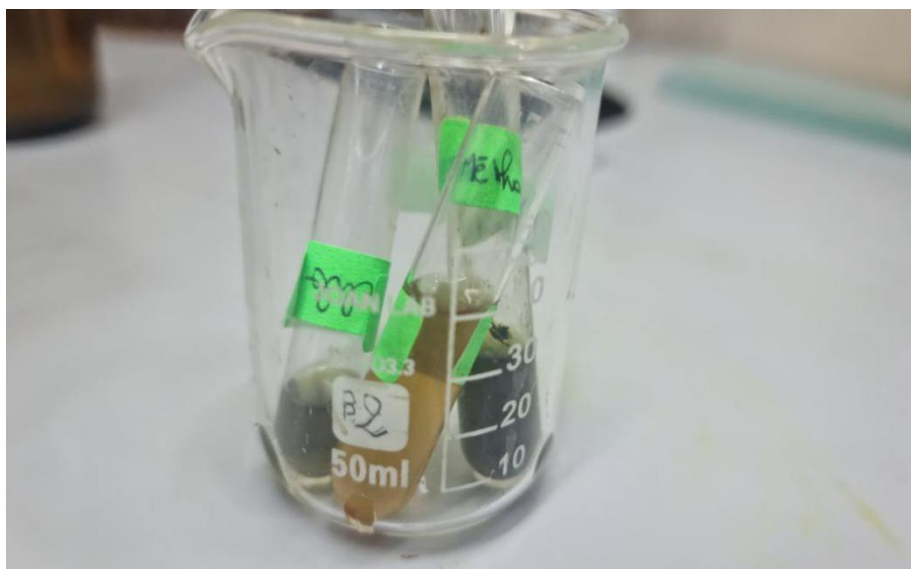


Figure 12: Préparation des solutions mères

a. Détection des polyphénols

Une méthode fréquemment utilisée pour détecter les polyphénols consiste à utiliser du chlorure ferrique (FeCl_3), cette réaction permet de révéler rapidement la présence de polyphénols dans une plante (Yondo et *al.*, 2013).

Cette méthode comprend les étapes suivantes dans les trois tubes à essai :

1. Introduire une quantité de chaque extrait (dichlorométhane, méthanolique et éthanol/eau) dans des tubes à essai distincts.

2. Ajouter quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl_3 à 10%) dans chaque tube.

L'apparition d'une couleur verte noirâtre dans un ou plusieurs tube indique la présence de polyphénols.

b. Détection des tannins

Pour la détection des tannins, la réaction suivante a été réalisée :

1. Verser 0,5 ml de chaque extrait dans un tube à essai, puis ajouter 0,5 ml d'eau.
2. Incorporer 1 à 2 gouttes d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3) diluée à 1%.

Préparation de la solution de FeCl_3 à 1% :

* Dissoudre 1 g de chlorure ferrique dans une fiole à jauge, puis compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

* L'apparition d'une coloration vert foncé ou bleu vert révèle la présence de tannins (Hamid El- Haoud et *al.*, 2018).

c. Détection des flavonoïdes

La détection des flavonoïdes repose sur la réaction à la cyanidine. Les étapes de la méthode sont les suivantes :

1. Dans trois tubes à essai, introduire 4 ml d'éthanol puis ajouter 1ml d'acide chlorhydrique (HCl) ainsi que 2 ml de chaque extrait.
2. Ajouter ensuite 3 fragments de magnésium dans chaque tube.
3. Observer une élévation de température accompagnée d'un changement de couleur vers le rose orangé ou le violet.
4. L'addition de quelques gouttes d'alcool isoamylique intensifie la teinte rose orangé ce qui confirme la présence des flavonoïdes.

d. Détection de mucilage

Un volume de 2,5 ml d'éthanol a été ajouté à 0,5 g de chaque extrait, après agitation l'obtention d'un précipité floconneux indique la présence de mucilages (Amadou, 2006).

e. Détection des saponosides

La détection qualitative des saponosides repose sur l'observation d'une mousse stable après agitation, pour cela 1g de chaque extrait est dissous dans 10 ml d'eau distillée puis la solution est fortement agitée de manière verticale pendant 15 à 30 secondes.

Après un repos de 15 minutes, la hauteur de la mousse persistante pendant 15 à 30 minutes et dépassant 1 cm en hauteur est un indicateur de la présence des saponosides (El-Haoud et *al.*, 2018).

2.3. Dosage des polyphénols totaux

a. Principe

Le dosage des polyphénols varie en fonction de plusieurs facteurs ; tel que la partie de la plante utilisée, la méthode d'extraction, l'origine géographique de la plante et les conditions de culture. Pour mesurer ces composés, différentes techniques analytiques sont utilisées ; notamment la spectrophotométrie, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ; qui permettent de quantifier les différents types de polyphénols présents dans un échantillon.

Dans le cadre de cette étude, la quantification des polyphénols a été réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu basée sur la spectrophotométrie. Cette méthode repose sur un réactif constitué d'un mélange d'acide phosphomohydrique et l'acide phosphotungstique; formant un complexe jaune. En présence de polyphénols, ce mélange réagit pour produire une coloration bleue avec une absorbance maximale mesurée à une longueur d'onde de 760 nm.

L'intensité de cette absorbance est proportionnelle à la concentration de polyphénols dans les extraits végétaux (Ghazi et Sahraoui, 2005).

b. Préparation des solutions

❖ Préparation des solutions mères

- 12,5 mg de l'extrait méthanolique dissout dans 2 ml de méthanol.
- 12,5 mg de l'extrait éthanolique dissout dans 2 ml d'éthanol/eau (1 ml éthanol/1 ml eau).

❖ Préparation des réactifs et des extraits utilisés

● Polyphénol témoin

L'acide gallique a été utilisé comme un polyphénol de référence. Une solution mère a été préparée en diluant 10 mg d'acide gallique dans 100 ml d'eau distillée.

● Réactif de Folin-Ciocalteu

- Le réactif a été préparé en mélangeant 10 ml du réactif Folin-Ciocalteu à 90 ml d'eau distillée.
- Une solution de carbonate de sodium à 7,5% a été obtenue en dissolvant 15 g de carbonate de sodium dans 200 ml d'eau distillée.

– Pour l'analyse standard, les étapes suivantes ont été suivies :

- 0,5 ml de la solution d'acide gallique/extrait à différentes concentrations a été ajouté dans chaque tube.
- Ensuite, 2,5 ml du réactif Folin-Ciocalteu ont été ajoutés, suivi d'un temps de repos de 2 minutes.
- Puis 2 ml de la solution de carbonate de sodium ont été ajoutés dans chaque tube.
- Les tubes ont été ensuite agités puis placés à l'obscurité pendant une heure.
- La lecture de l'absorbance a été effectuée à une longueur d'onde de 760 nm.

● Dilutions

► Une série de 6 tubes a été préparée pour chaque extrait, en utilisant une demi dilution.

► Chaque tube contient 1 ml de solution ; le 1^{er} tube renferme la solution mère, pour les tubes suivants, 1 ml de la solution du tube précédent est prélevé puis mélangé à 1 ml du solvant approprié afin d'obtenir une dilution à 1/2 à chaque étape. Cette procédure est répétée jusqu'au sixième tube.

- Le méthanol a été utilisé pour la dilution de l'extrait méthanolique.
- L'éthanol et l'eau ont été utilisés pour la dilution de l'extrait éthanol/eau.

c. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode de séparation physico-chimique qui repose sur des phénomènes d'absorption permettant de distinguer différentes substances selon leur affinité pour une phase stationnaire et une phase mobile. Les composés

migrent différemment en fonction de leur capacité à s'adsorber ou à se dissoudre dans ces phases, ce qui permet leur séparation.

Pour cette expérience, un support en silice a été utilisé ; bien qu'il existe d'autres types comme l'alumine ou la cellulose, souvent montés sur des plaques d'aluminium ; certaines plaques contiennent un indicateur fluorescent.

La préparation de la plaque consiste à découper un rectangle de 9 cm sur 12 cm, tracer une ligne de dépôt à 1 cm du bas et une autre ligne en haut pour repérer la limite de migration du solvant. Quatre points sont ensuite marqués sur la ligne de dépôt à intervalles réguliers pour y appliquer de très petites gouttes des extraits à l'aide d'une micropipette ou d'une pipette pasteur. On utilise des solvants comme le dichlorométhane, le méthanol ou éthanol/eau ; et l'acide gallique comme témoin.

Il est essentiel d'éviter de toucher la plaque avec les doigts. Une fois préparée, la plaque est placée dans une cuve fermée contenant l'éluant jusqu'à ce que le front du solvant atteigne environ 1 cm du bord supérieur, moment où on arrête la chromatographie.

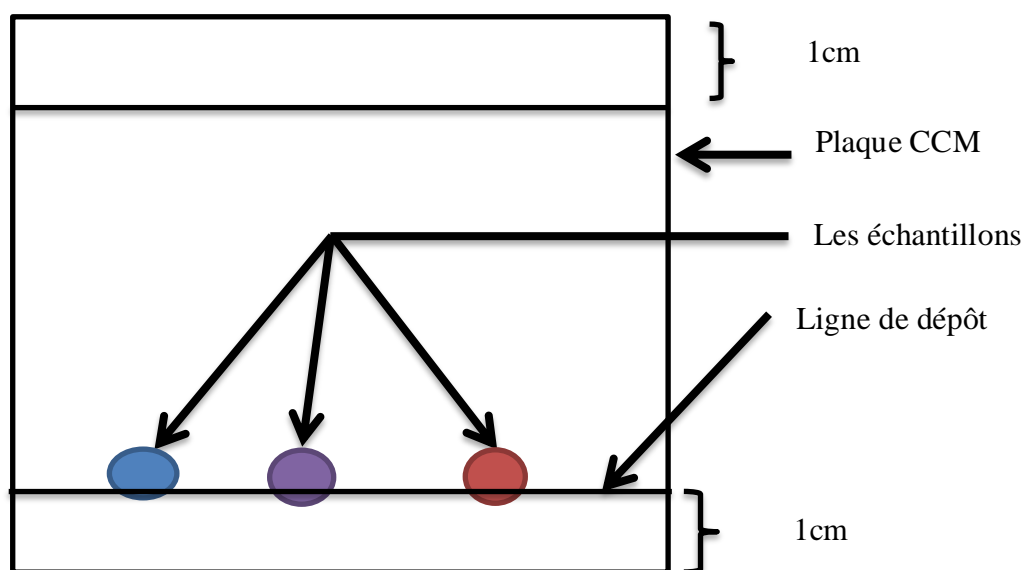


Figure 13: Schéma explicatif de la CCM

On a testé deux systèmes solvants afin d'obtenir une séparation optimale des extraits. Pour ce faire, on a utilisé des plaques en gel de silice d'une épaisseur de 0,5 mm.

La phase mobile est constituée d'un mélange de solvants organiques.

Les systèmes solvants évalués sont :

- 1) Acétate d'éthyle / méthanol / H₂O (10/2/1)
- 2) Chloroforme / méthanol / H₂O (9/1/0,1)

Après l'évaluation des systèmes solvants un révélateur a été utilisé dont la composition est la suivante :

- Ajouter 2 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 200 ml d'éthanol à 90-96 % (ou 190 ml d'éthanol absolu et 10 ml d'eau désionisée),
- Ajouter 800-1 000 mg de vanilline et agiter jusqu'à dissolution complète,
- Conserver à l'abri de la lumière.

Ce révélateur est utilisé en spray ou par trempage suivi d'un chauffage à environ 200°C jusqu'à ce que les taches apparaissent.

Il est important de noter que ce type de révélation produit souvent des couleurs intenses dans tout le spectre visible et que la couleur d'une tache est caractéristique du composé révélé.

2.4. Activité antibactérienne

Dans cette section de l'étude, nous avons recherché les activités antibactériennes présentes dans les extraits de *Marrubium vulgare*. L'activité antibactérienne de ces extraits a été testée sur 3 souches bactériennes : *E. coli*, *Streptococcus sp*, *Bacillus*.

- En culture sur des milieux lactosés classiques, *E.coli* forme des colonies arrondies, lisses, aux contours nets mesurant entre 2 et 3 mm de diamètre après 18 à 24 heures d'incubation.
- **Streptocoques** : Les streptocoques sont des bactéries sphériques à gram positif appartenant au genre *Streptococcus*. Elles se disposent typiquement en chaînes ou en paires et sont dépourvues de mobilité ainsi que de spores. Les streptocoques sont des cocci anaérobies facultatifs, largement présents dans les muqueuses humaines, notamment au niveau de la bouche, du pharynx et de l'intestin. Certaines espèces sont commensales, tandis que d'autres sont responsables d'infections variées telles que les angines et les infections cutanées (Murray et al., 2020).
- **Bacilles** : est un genre de bactéries à gram positif, en forme de bâtonnets, largement répandu dans l'environnement (sols, eaux, surfaces...). Ce sont des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, capables de former des spores hautement résistantes aux conditions défavorables (Madigan et al., 2011).

a. Test de l'activité antibactérienne

L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne est une méthode ancienne, mais toujours d'actualité. Elle demeure largement utilisée dans les laboratoires de bactériologie pour évaluer l'efficacité de substances contre les bactéries (Baala et Mermoul, 2021).

❖ Préparation des extraits

Pour la préparation des extraits, 50 mg de chaque extrait ont été dissous dans 2 ml de solvants appropriés. Afin de réaliser les dilutions, 1 ml de la solution mère a été prélevé et mélangé à 1 ml d'un solvant pour obtenir une dilution au demi (1/2). Nous avons préparé quatre dilutions.

- L'extrait dichlorométhanolique a été dissout dans CH_2Cl_2 .
- L'extrait méthanolique a été dissout dans CH_3OH .
- L'extrait éthanol/eau a été dissout dans l'éthanol/eau.

❖ Préparation des disques

Des disques de 6 mm de diamètre ont été découpés à partir du papier filtre Watman n°1. Ces disques ont ensuite été enveloppés dans du papier aluminium, puis stérilisés à 110°C pendant 15 minutes.

❖ Milieu de culture

À cette étape, le milieu Mueller Hinton chaud est versé dans des boîtes de Pétri. L'épaisseur de la gélose est de 4 mm.

❖ Préparation de l'inoculum

À l'aide d'une anse de platine, nous allons prélever des colonies de bactéries cultivées sur gélose nutritive et émulsionnées dans du bouillon nutritif.

❖ Ensemencement

L'ensemencement a été réalisé sur des boîtes de pétri à l'aide d'un écouvillon stérile, préalablement imbibé de la suspension bactérienne. Après avoir été pressé contre la paroi interne du tube pour éliminer l'excès de liquide, l'écouvillon a été passé sur toute la surface de la gélose selon un mouvement de va et vient en lignes droites verticales. Cette opération a été répétée trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque passage, afin d'assurer une répartition homogène de la

culture. Un dernier passage sur l'ensemble de la surface a permis de compléter l'ensemencement.

❖ Application des disques

Des disques stériles, imprégnés d'un extrait à tester à la concentration de 25 mg/ml, ont été déposés à l'aide d'une pince stérile sur la surface du milieu gélosé. Chaque disque a été appliqué avec précaution en appuyant légèrement afin qu'il adhère à la gélose sans glisser. Les boîtes ainsi préparées ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Nous avons également préparé des boîtes témoins contenant les solvants utilisés pour solubiliser les extraits.

❖ Lecture des boîtes

La lecture des résultats a consisté à mesurer le diamètre des zones d'inhibition formées autour des disques à l'aide d'une règle graduée. Le diamètre relevé inclut celui du disque lui-même.

Chapitre V

Résultats et discussion

1. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction des composés phénoliques est influencé par la méthode utilisée, les caractéristiques du solvant, la température d'extraction ainsi que la taille des particules constituant la poudre de la plante.

Dans notre étude, nous avons réalisé une extraction solide/liquide de la plante *Marrubium vulgare* ; en utilisant des solvants à polarité croissante notamment : dichlorométhane, méthanol, éthanol/eau.

Après obtention des extraits, le rendement d'extraction a été calculé pour chacun d'eux, donnant les résultats mentionnés dans le Tableau 5.

Le poids ou la masse de l'extrait sec est déterminée par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation) selon l'équation suivante :

$$\text{La masse de l'extrait sec} = P0 - P1$$

Dont :

- P0 : le poids du ballon plein (après évaporation)
- P1 : le poids du ballon vide (avant évaporation)

On peut calculer le rendement **R** d'extraction selon l'équation suivante :

$$R\% = \frac{\text{la masse d'extrait sec}}{\text{la masse du matériel végétal}} * 100$$

Tableau 5: Le rendement d'extraction en (g) et en (%)

Extrait	Dichlorométhane	Méthanol	Ethanol/eau
Les calculs			
Poids d'extrait sec en (g)	2,99	3,08	2,95
Le rendement d'extraction en (%)	6,95	7,16	6,86

L'analyse de ce tableau révèle des variations du taux d'extraction selon le solvant utilisé avec une valeur légèrement plus élevée pour l'extrait méthanolique. Par conséquent, le *Marrubium vulgare* est riche en composés bioactifs (Figure 14).

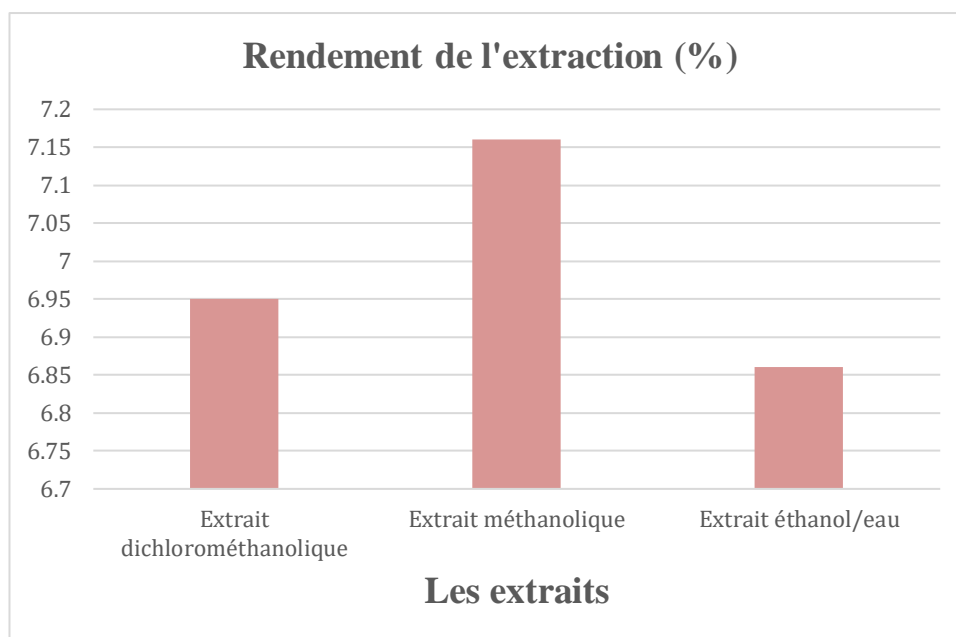


Figure 14 : Représentation graphique des rendements d'extraction en (%) des extraits de *Marrubium vulgare*

2. Screening phytochimique

Un screening phytochimique a été réalisé afin de déterminer qualitativement les différentes familles de métabolites secondaires que renferme notre plante. Les résultats obtenus sont cités dans le Tableau 6 :

Tableau 6: Résultats du screening phytochimique

Extrait Test	Dichlorométhane	Méthanol	Ethanol / eau	Résultats
Polyphénols	(++)	(+++)	(-)	(+) Coloration vert noirâtre (-) Absence de cette couleur
Tannins	-	-	+	(+) Coloration vert foncé ou bleu vert (-) Absence de cette couleur
Flavonoïdes	-	+++	+	(+) Coloration rose-orangé ou violet (-) Absence de cette couleur
Mucilages	+++	-	-	(+) Présence d'un précipité floconneux (-) Absence du précipité

Saponosides	-	-	+	(+) Présence d'une mousse ou son hauteur égale à 1cm (-) Absence de la mousse
-------------	---	---	---	--

Dont :

- (+++) : fortement positif.
- (++) : Moyennement positif.
- (+) : Faiblement positif.
- (-) : Négatif.

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, nous avons noté que le *Marrubium vulgare* est riche en polyphénols surtout pour l'extrait méthanolique, de même nous avons remarqué une présence des tannins dans l'extrait éthanol/eau. Les flavonoïdes sont fortement positifs dans l'extrait méthanolique, moyennement positif dans l'extrait éthanol/eau et négatif dans l'extrait dichlorométhanolique.

Nous avons également constaté que les mucilages ne sont pas présents dans les extraits méthanolique et éthanol/eau alors qu'ils sont présents dans l'extrait dichlorométhanolique.

On note aussi la présence des saponines seulement dans l'extrait éthanol/eau.

3. Dosages des phénols totaux

D'après les résultats du test de dosage, nous avons tracé la courbe d'étalonnage comme suit (Figure 15) :

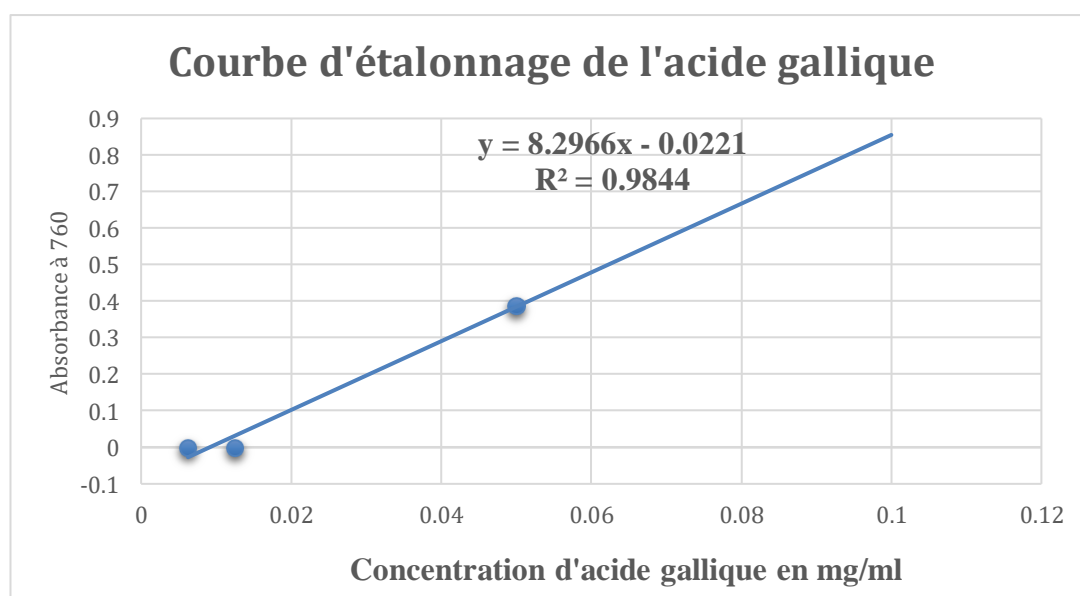


Figure 15: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Selon la courbe d'étalonnage, nous avons obtenus l'équation suivante :

$$y = 8,2966x - 0,0221 \quad \text{Avec un } R^2 = 0,9844.$$

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits du *Marrubium vulgare*, exprimés en mg équivalent d'acide gallique (EAG)/g d'extrait, sont calculés selon l'équation précédente pour chaque extrait (Figure16).

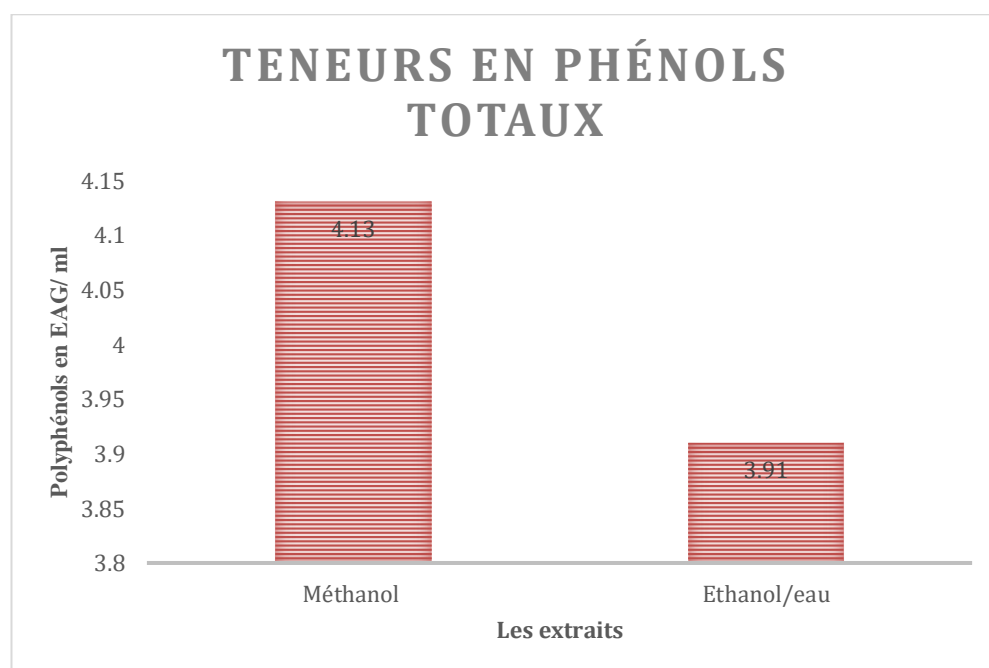


Figure 16: Représentation graphique des teneurs en phénols totaux des extraits de *Marrubium vulgare*

En général, tout le contenu phénolique dans les extraits examinés de notre plante utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est exprimé en termes d'équivalent d'acide gallique par l'équation du standard :

$$y = ax + b \quad \text{où : } y = \text{l'absorbance}$$

D'après notre travail l'équation est exprimée comme suit :

$$y = 8,2966x - 0,0221 \quad \text{Avec un } R^2 = 0,9844.$$

Les valeurs obtenues pour la concentration des polyphénols totaux sont exprimées en mg EAG/g d'extrait. Ces résultats montrent que la concentration la plus élevée a été mesurée dans l'extrait méthanolique suivie par l'extrait hydro-alcoolique.

D'après Matkowski et *al.*, (2008), toutes les plantes de la famille des lamiacées sont reconnues pour leur richesse en composés phénoliques ce qui est confirmé par les analyses montrant la présence de ces métabolites secondaires dans les extraits de *Marrubium vulgare*.

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits de *M.vulgare* a révélé que l'extrait méthanolique possède la teneur la plus élevée avec 195 ± 36 mg EAG/g d'extrait suivie de l'extrait aqueux avec $175 \pm 0,80$ mg EAG/g.

Enfin Wojdylo et *al.*, (2007) ont comparé six espèces de lamiacées ; et ont montré que les teneurs en polyphénol totaux suivent l'ordre décroissant suivant : baume > sauge > marrube > romarin > thym > origan. Ils ont aussi souligné que la teneur en composés phénoliques varie en fonction du solvant et de la méthode d'extraction utilisée.

4. Chromatographie sur couche mince

Nous avons testé deux systèmes solvants sur les trois extraits, néanmoins, l'éluant « chloroforme /méthanol /eau (9/1/0,1) » est celui qui a donné la meilleure séparation.

Après avoir placé la plaque dans la cuve, on a procédé à la lecture à l'aide d'une lampe UV aux longueurs d'ondes 254 nm et 365 nm.



Figure 17 : Chromatographie sur couche mince
à 254 nm

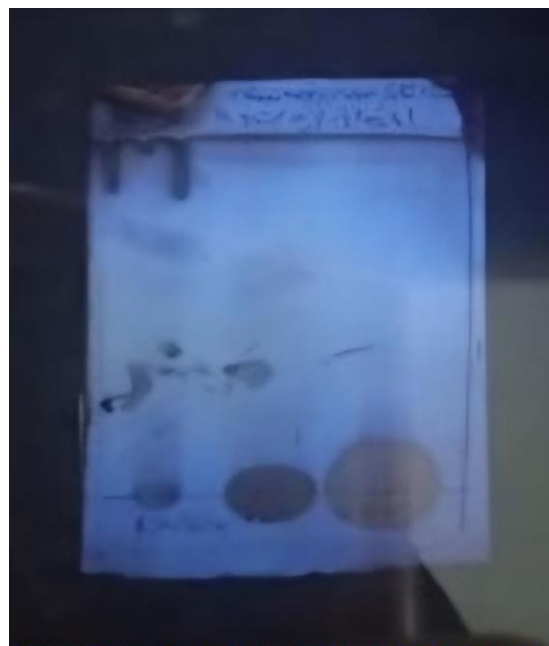


Figure 18 : Chromatographie sur couche mince à 365 nm

Ensuite la plaque a été immergée dans le révélateur, puis séchée à 200°C avant une finale observation.



Figure 19: Chromatographie sur couche mince après utilisation du révélateur

5. Activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion en milieu solide. L'évaluation des résultats consiste à observer l'existence ou non de zones d'inhibition autour des disques. Au cours de notre étude, nous avons réalisé des témoins solvants afin de vérifier que les solvants utilisés n'ont pas d'activité antibactérienne.

La sensibilité des espèces testées est déterminée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des disques imprégnés de différentes concentrations des extraits méthanolique, éthanol/eau et dichlorométhane ; en utilisant plusieurs souches bactériennes :

- ✓ Bactérie gram (+) : *Bacillus*, *Streptococcus*.
- ✓ Bactérie gram (-) : *Escherichia coli*.

Les résultats des tests antimicrobiens sont regroupés dans le Tableau 7 qui présente les différentes valeurs de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

❖ Détermination de la CMI

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique/ extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne. Elle permet d'évaluer la sensibilité de l'agent pathogène à un antibiotique.

- ✓ Une CMI faible indique une plus grande sensibilité à l'antibiotique ou l'extrait.
- ✓ Une CMI élevée traduit une sensibilité plus faible.

Tableau 7 : Les CMI obtenus des différents extraits de *Marrubium vulgare*

Souches	Extraits	Zones d'inhibition (mm)	CMI (mg/ml)
<i>E. Coli</i>	Méthanol	C2 :8	12,5
	Ethanol/eau	C2 :9	12,5
	Dichlorométhane	C3 :13	6,25
<i>Streptococcus</i>	Méthanol	C2 :9	12,5
	Ethanol/eau	C3 :9	25
	Dichlorométhane	C1 :15	25
<i>Bacillus</i>	Méthanol	C2 :11	12,5
	Dichlorométhane	C3 :10	6,25
	Ethanol/eau	C2 :12	12,5

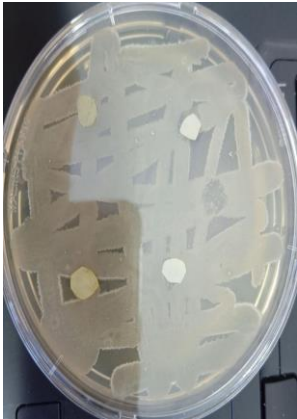

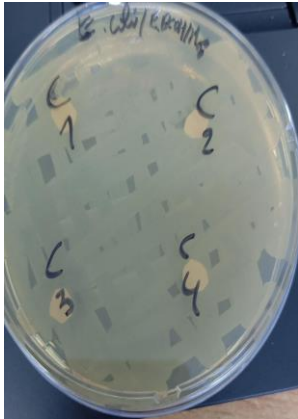
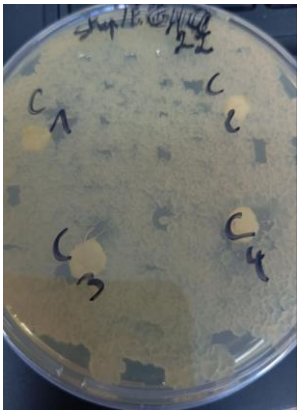


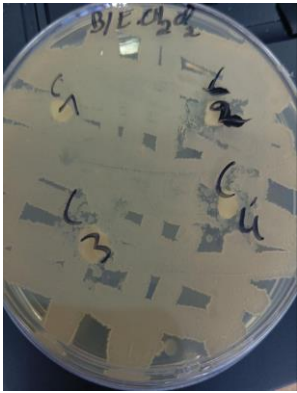

Dont : *C1 : C'est la concentration mère.

*C2 : C'est la 2^{ème} dilution.

*C3 : C'est la 3^{ème} dilution.

❖ Présentation des zones d'inhibition

Tableau 8: Résultats des CMI des trois souches bactériennes après 24h d'incubation à 37°

	Extrait dichlorométhanolique	Extrait méthanolique	Extrait éthanol/eau
<i>E. Coli</i>			
<i>Streptococcus</i>			
<i>Bacillus</i>			

D'après ces résultats des tests de l'activité antibactérienne, on peut conclure que :

- *Escherichia coli* est sensible à l'extrait dichlorométhane avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 13 mm et une CMI de 6,25 mg/ml. Ce qui montre une forte activité.
- *Streptococcus* est une souche également sensible à l'extrait dichlorométhane avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 15 mm et une CMI de 25 mg/ml, indiquant une faible activité antibactérienne.
- De même, la souche *Bacillus* montre une faible sensibilité aux extraits testés avec des zones d'inhibition faible.

Nous concluons que l'extrait dichlorométhanolique est le plus actif contre *Streptococcus* et *Escherichia coli*, tandis que l'extrait méthanolique et éthanol/eau montrent une activité faible à modérée.

Cette action antimicrobienne est confirmée par le fait que la plante produit différents métabolites secondaires appartenant à certaines classes reconnues pour leurs activités biologiques, telles que les composés phénoliques (Bruneton et *al.*, 1990).

Les terpénoïdes comme le marrubiine retrouvés dans l'espèce *Marrubium vulgare*, sont également bien connu pour leurs propriétés : antimicrobienne (El-Bardai et *al.*, 2004) ; antispasmodique et anti-inflammatoire (Stulzer et *al.*, 2006) ; cholérétique, anti-hypertensive (Yousefi et *al.*, 2014).

Par ailleurs, plusieurs travaux mettent en évidence la sensibilité plus marquée du *Marrubium vulgare* à l'égard des bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif (Bouterfas et *al.*, 2014 ; Kanyonga et *al.*, 2011 ; Boudjelal et *al.*, 2012).

Cela pourrait être attribué à la différence dans la composition des enveloppes cellulaires : en effet, les bactéries à Gram négatif possèdent une couche supplémentaire de membrane externe composée de phospholipides et de protéines, formant une barrière imperméable qui joue un rôle protecteur.

En outre, les résultats obtenus montrent que l'activité antibactérienne dépend de plusieurs facteurs, notamment la période de récolte, la nature des solvants utilisés, le type de micro-organisme ciblé, la concentration, le type d'extrait, ainsi que la nature et la structure moléculaire des composés bioactifs issus des métabolites secondaires.

Selon l'étude réalisé par Ghedadba, H. et *al.*, 2014, le méthanol, en tant que solvant polaire, est capable d'extraire un maximum de principes actifs appartenant à diverses classes de métabolites secondaires (Ghedadba, H et *al.*, 2014).

Conclusion

Marrubium vulgare est une plante médicinale largement connue en Algérie ainsi que dans les régions méditerranéennes. Elle est couramment utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés antidiabétiques, antimicrobiennes et antiprolifératives.

Dans le cadre de cette étude, nous avons tout d'abord procédé à l'extraction des métabolites secondaires de la plante en utilisant divers solvants, à savoir : le dichlorométhane, le méthanol et un mélange éthanol/eau. Cette étape nous a permis d'obtenir 2,9 g d'extrait dichlorométhanolique, 3,08 g d'extrait méthanolique et 2,95 g d'extrait éthanol/eau.

Par la suite, un screening phytochimique a été réalisé sur ces trois extraits afin d'identifier les principales familles de métabolites secondaires, nous avons noté que le *Marrubium vulgare* est riche en polyphénols surtout l'extrait méthanolique. Une chromatographie sur couche mince a également été effectuée pour séparer les différentes substances présentes.

Le dosage des polyphénols a été mené par spectrophotométrie, en utilisant une courbe d'étalonnage établie à partir de l'acide gallique, afin de quantifier le contenu polyphénolique des extraits analysés. La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait méthanolique.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne contre différentes souches bactériennes a révélé que l'extrait dichlorométhanolique, présentait une activité inhibitrice notable vis-à-vis d'*Escherichia coli* et de *Streptococcus*.

Ces résultats confirment la présence dans la plante de métabolites secondaires appartenant à des familles reconnues pour leurs effets biologiques, notamment les composés phénoliques et les terpénoïdes.

Enfin, les résultats obtenus suggèrent que *Marrubium vulgare* constitue une source prometteuse de composés bioactifs pouvant être valorisés à des fins thérapeutiques. Toutefois, ces données représentent une étape préliminaire dans la valorisation de cette espèce végétale à potentiel pharmacologique.

Il serait donc pertinent de poursuivre ces travaux par des tests complémentaires, notamment pour évaluer les activités antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits.

De telles investigations permettraient de mieux caractériser le potentiel thérapeutique de la plante et d'envisager son intégration dans le développement de traitements à base de produits naturels.

Références

- **Abadi, A., & Hassani, A.** (2013). Essential oil composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Eastern Algeria. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 14, 17–24.
- **Ahmed, B., Masoodi, M. H., Siddique, A. H., & Khan, S.** (2010). A new monoterpene acid from *Marrubium vulgare* with potential antihepatotoxic activity. *Natural Product Research*, 24, 1671–1680.
- **Akkol, E. K., Göger, F., Koşar, M., & Başer, K. H. C.** (2012). Pharmacological activities of *Marrubium vulgare* L. extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(1), 25–32.
- **Al Khatib, A., Fadli, M., Saad, A., et al.** (2010). Antibacterial and antifungal activity of *Marrubium vulgare* extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(15), 1511–1515.
- **Alkhatib, R., Joha, S., Cheok, M., Roumy, V., Idziorek, T., Preudhomme, C., et al.** (2010). Activity of ladanein on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare*. *Planta Medica*, 76, 86–87.
- **Amadou, A.** (2006). Étude d'une recette traditionnelle, des écorces de tronc de *Sclerocarya birrea* et d'*Uapaca togoensis* utilisées dans le traitement de diabète. Thèse de doctorat, Faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie, p. 55.
- **Amessis-Ouchemoukh, N., Abu-Reidah, I. M., Quirantes-Piné, R., Madani, K., & Segura-Carretero, A.** (2014). Phytochemical profiling, in vitro evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 61, 120–129.
- **Amroune S.** (2018). Phytothérapie et plantes médicinales. Université des Frères Mentouri.
- **Baala, O., & Mermoul, A.** (2021). Etude phytochimique des extraits d'une plante médicinale : *Eriobotrya japonica* Lindl. Mémoire de Master 2 en Sciences Biologiques, Biochimie. Université Frères Mentouri, Constantine.
- **Balmé, F.** (1982). *Plantas medicinais*. São Paulo : Éditions Hemus Ltda.
- **Barnes, J., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D.** (2007). *Herbal Medicines* (3e éd.), Pharmaceutical Press.
- **Bellakhdar, J.** (1997). *Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires : La pharmacopée marocaine traditionnelle* (pp. 340–341). Casablanca : Ibis Press.
- **Bennick, A.** (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(2), 184–196.

- **Berrougui, H., Maxim, I., Cherki, M., & Khalil, A. (2006).** *Marrubium vulgare* extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage. *Life Sciences*, 80, 105–112.
- **Bokaeian, M., Saboori, E., Saeidi, S., Niazi, A. A., Amini-Borojeni, N., Khaje, H., & Bazi, S. (2014).** Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Marrubium vulgare* L. against *Staphylococcus aureus* in vitro. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(10), 60–64.
- **Bonnet, E. D. (2012).** Note sur le *Marrubium vulgare* L., nomenclature, taxonomie, synonymie. *Tela Botanica*, 282–287.
- **Boudjelal, A., Henchiri, C., Siracusa, L., Sari, M., & Ruberto, G. (2012).** Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia*, 83, 286–292.
- **Bouhaddouda, N., Aouadi, S., & Labiod, R. (2016).** Evaluation of chemical composition and biological activities of essential oil and methanolic extract of *Origanum vulgare*.
- **Boullard, B. (2001).** *Plantes médicinales du monde* (pp. 340–341). Paris : Éditions Estem.
- **Boulos, L. (1983).** *Medicinal plants of North Africa*. Algonac, MI : Reference Publications Inc.
- **Bourhia, M., Shahat, A. A., Almarfadi, O. M., et al. (2019).** Ethnopharmacological survey of herbal remedies used for the treatment of cancer in the Greater Casablanca-Morocco. *Hindawi*, 2019, Article ID 1234567.
- **Boutabia, L., Telailia, S., & Menaa, M. (2020).** Utilisations thérapeutiques traditionnelles du *Marrubium vulgare* L. par les populations locales de la région de Haddada (Souk Ahras, Algérie), 1–11.
- **Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Benmansour, D., Khaled, M. B., Bouterfas, M., & Latreche, A. (2014).** Optimization of extraction conditions of some phenolic compounds from white horehound (*Marrubium vulgare* L.) leaves. *International Journal of Organic Chemistry*, 4, 292–308.
- **Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Elaoufi, M. M., Latreche, A., & Benchiha, W. (2016).** Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. *Annales de Pharmacie Française*. Advance online publication.

- **Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Latreche, A., Hazem, Z., & Bouredja, N.** (2013). Quantification de quelques polyphénols de *Marrubium vulgare* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale) pendant les deux périodes de végétation et de floraison. *Journal des Technologies de Laboratoire*, 8(31), 34–41.
- **Bouzred, S., & Damak, M.** (2022). Étude préliminaire de l'activité antibactérienne d'une plante médicinale : *Corchorus olitorius* L. Mémoire de Master 2 en Sciences Biologiques, Biochimie. Université Frères Mentouri, Constantine.
- **Bremnes, L.** (2005). *The complete book of herbs: A practical guide to growing & using herbs*. Montréal, Canada : Reader's Digest.
- **Chase, M. W., Fay, M. F., Reveal, J. L., et al.** (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105–121.
- **Chevalier, A.** (2008). *Les plantes médicinales : Remèdes, posologies, préparations, propriétés thérapeutiques et soins*.
- **Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G., Uzunov, D., & Tubaro, A.** (2008). The protective ability of *Marrubium vulgare* against inflammation causes. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 379–386.
- **De Souza, M. M., De Jesus, R. A. P., Cechinel-Filho, V., & Schlemper, V.** (1998). Analgesic profile of hydro-alcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine*, 5(2), 103–107.
- **Demmak, R. G., Abdel-Mogib, M., Bordage, S., Samaillie, J., Benssouici, C., Bensegueni, A., Neut, C., & Sahpaz, S.** (2021). Antibacterial and antioxidant activities of a novel enol ether nor-sesquiterpene isolated from *Myrtus nivellei* Batt. & Trab. *Fitoterapia*, 153, Article 104987.
- **Djabou, N.** (2006). *Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique d'huiles essentielles de plantes aromatiques algériennes* (Thèse de doctorat). Université d'Annaba, Algérie.
- **Duke, J. A.** (2002). *Handbook of medicinal herbs*. CRC Press.
- **El-Bardai, S., Lyoussi, B., Wibó, M., & Morel, N.** (2004). Comparative study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Hypertension*, 26(6), 465–474.
- **Elberry, A. A., Harraz, F. M., Ghareib, S. A., Gabr, S. A., Nagy, A. A., & Abdel-Sattar, E.** (2015). Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia

- and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 3, 37–44.
- **El-Haoud, H., Boufellous, M., & Berrani, A.** (2018). *Screening phytochimique d'une plante médicinale : Mentha spicata L.* [Mémoire de master, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie].
 - **Ghazi, F., & Sahraoui, F. S.** (2013). Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tamhboucht et Hamraya. *Food and Chemical Toxicology*, 55(1), 78–91.
 - **Ghedadba, H., Bousselsela, H., Hambaba, L., Benbia, Y., & Mouloud, Y.** (2014). Évaluation de l'activité antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare L.* *Phytothérapie*, 12, 15–24.
 - **Ghedadba, N., Hambaba, L., Bousselsela, H., et al.** (2016). Evaluation of in vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of white horehound (*Marrubium vulgare L.*) leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review*, 41, 252–259.
 - **Hameg, T., & Taleb, D.** (2018). *Évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante des composés phénoliques du Marrube blanc (Marrubium vulgare L.)* (Mémoire de magistère). Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie. p. 6.
 - **Hamid El-Haoud, Boufellous, M., Berrani, A., Tazougart, H., & Bengueddour, R.** (2018). Screening phytochimique d'une plante médicinale: *Mentha spicata L.* *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 7(4), 226–233.
 - **Hamza, N., Berke, B., Cheze, C., Agli, A. N., & Molinier, J.** (2019). Étude pharmacologique des propriétés antidiabétiques de *Marrubium vulgare*. *Journal of Ethnopharmacology*.
 - **Hellal, K., Maulidiani, M., Ismail, I. S., & Tan, C. P.** (2020). Antioxidant, α -glucosidase, and nitric oxide inhibitory activities of six Algerian traditional medicinal plant extracts and 1H-NMR-based metabolomics study of the active extract. *Molecules*, 25(18), Article 4274.
 - **Heller, R., Esmault, R., & Lance, C.** (1998). *Physiologie végétale* (6e éd.). Dunod.
 - **Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R.** (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare*.
 - **Kanyonga, P. M., Faouzi, M. A., Meddah, B., Mpona, M. E., & Y. C.** (2011). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3, 202.

- **Karryev, M. O., Bairyev, C. B., & Ataeva, A. S.** (1976). Some therapeutic properties and phytochemistry of common horehound. *Seriya Biologicheskikh Nauk*, 3, 86–88.
- **Kearney, T. H., & Peebles, R. H.** (1960). *Arizona flora*. University of California Press.
- **Lagnika.** (2005). *Étude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises* (Thèse de doctorat en sciences pharmaceutiques, Pharmacognosie). Strasbourg 1.
- **Lee, S. Y., Lee, D. Y., Kim, O. Y., et al.** (2020). Overview of studies on the use of natural antioxidative materials in meat products. *Food Science of Animal Resources*, 40, 863–880.
- **Macheix, C., et al.** (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Collection Biologique. Presses polytechniques et universitaires romandes, p. 77.
- **Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A.** (2018). Brock – Biologie des micro-organismes (14e éd.). Pearson Éducation.
- **Matkowski, A., Tasarz, P., & Szygula, E.** (2008). Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(11), 321–330.
- **Middleton, E. Jr, & Kandaswami, C.** (1994). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In J. B. Harborne (Ed.), *The flavonoids. Advances since 1986* (pp. 619–645). London : Chapman and Hall.
- **Mohamed, A., & Nada, M.** (2019). Contribution à l'étude des familles botaniques de la flore médicinale en Algérie.
- **Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A.** (2020). Microbiologie médicale (9eme éd.). Elsevier Masson.
- **Nawwar, M. A. M., El-Mousallamy, A. M. D., Barakat, H. H., Buddrus, J., & Linscheid, M.** (1989). Flavonoids lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, 28, 3201–3206.
- **Nawwar, M. A. M., Hussein, S. A. M., & Merfort, I.** (1989). Flavonoids from *Marrubium vulgare* and their antioxidant activity. *Planta Medica*, 55(1), 88–89.
- **Neamah, S. I., Sarhan, I. A., & ONA-S, M.** (2019). Extraction and evaluation of the anti-inflammatory activity of six compounds of *Marrubium vulgare* L.

- **Newall, C. A., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D.** (1996). Herbal medicines: A guide for health care professionals. The Pharmaceutical Press, London.
- **Ono, E., Hatayama, M., Misono, Y., Sato, T., Watanabe, R., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., Nishino, T., & Nakayama, T.** (2006). Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant Journal*, 45, 133–143.
- **Orhan, I. E., Belhattab, R., Senol, F. S., Gülpinar, A. R., Hosbas, S., & Kartal, M.** (2010). Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Industrial Crops and Products*, 32, 566–571.
- **Ożarowski, M., & Glowacka, A.** (2021). Phytochemical and pharmacological potential of *Marrubium vulgare*: A review on traditional and modern uses. *Phytomedicine*, 90, 153636.
- **Pavela, R.** (2004). Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia*, 75, 745–749.
- **Polverino de Laureto, P., Palazzi, L., & Acquasaliente, L.** (2017). Polyphenols as potential therapeutic drugs in neurodegeneration. Progetti di Ateneo–University of Padova MIUR-PNRA (Programma Nazionale Ricerche in Antartide).
- **Pukalskas, A., van Beek, T. A., & Venskutonis, P. R.** (2012). Flavonoids from *Marrubium vulgare* and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 135(2), 1055–1063.
- **Pukalskas, A., Venskutonis, P. R., Salido, S., Waard, P., & Van Beek, T. A.** (2012). Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. *Food Chemistry*, 130, 695–701.
- **Rahimmalek, M., Goli, S. A. H., Tabatabaei, B. E. S., Arzani, A., & Zeinali, H.** (2009). Essential oil variation among 21 *Marrubium vulgare* accessions collected from different geographical regions of Iran. *Chemistry & Biodiversity*, 6(8), 1341–1352.
- **Rejeb, I.** (2008). Étude de l'effet de l'irradiation sur les polyphénols du curcumin (Diplôme d'ingénieur). Université du 7 novembre à Carthage, Tunisie, p. 3.
- **Rhallab, A., et al.** (2015). Effects of repeated administration of *Marrubium vulgare* on blood glucose, uric acid, and serum creatinine levels.
- **Ribereau-Gayon, P.** (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris, 166 p.

- **Rodríguez Villanueva, J., Villanueva, J. M. E., & L. R.** (2017). A reassessment of the *Marrubium vulgare* L. herb's potential role in diabetes mellitus type 2: First results guide the investigation toward new horizons. *Medicines*, 4(2), Article 24.
- **Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M., & Bailleul, F.** (2002a). Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoids esters from *Marrubium vulgare*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 389–392.
- **Sahpaz, S., Hennebelle, T., & Bailleul, F.** (2002b). Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Natural Product Letters*, 16(3), 195–199.
- **Said, A., Aboutabl, E., Nasr, N., & Ross, S. A.** (2016). Antioxidant and hepatoprotective activities of *Marrubium vulgare*. *Natural Product Research*, 30(22), 2562–2566.
- **Salinas, G. M. M., Guerra, M. C. R., Villareal, J. V., Cardenás, B. D. M., Montes, P. B., & Fernández, S. S.** (2005). Bacterial activity of organic extracts from *Flourensia cernua* against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Medical Research*, 37, 45–49.
- **Schlemper, V., Ribas, A., Nicolau, M., & Cechinel-Filho, V.** (1996). Antispasmodic effects of hydro-alcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. *Phytomedicine*, 3(2), 211–216.
- **Seeram, N. P., Henning, S. M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., & Heber, D.** (2006). Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *Journal of Nutrition*, 136(10), 2481–2485.
- **Shaheen, F., Rasool, S., Shah, Z. A., Soomro, S., Jabeen, A., Mesaik, M. A., & Choudhary, M. I.** (2014). Chemical constituents of *Marrubium vulgare* as potential inhibitors of nitric oxide and respiratory burst. *Natural Product Communications*, 9(7), 903–906.
- **Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D.** (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67–103.
- **Shawky, E.** (2019). Prediction of potential cancer-related molecular targets of North African plants constituents using network pharmacology-based analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 238, 111826.
- **Stulzer, H. K., Tagliari, M. P., Zampirolo, J. A., Cechinel-Filho, V., & Schlemper, V.** (2006). Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3), 379–384.

- **Twaij, B. M., & Hasan, M. N.** (2022). Bioactive secondary metabolites from plant sources: Types, synthesis, and their therapeutic uses. *International Journal of Plant Biology*, 13(1), 4–14.
- **Wichtl, M.** (2004). *Herbal drugs and phytopharmaceuticals*. Medpharm Scientific Publishers.
- **Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R.** (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940–949.
- **Wolski, T., Kiss, A. K., & Naruszewicz, M.** (2007). Influence of flavonoids from *Marrubium vulgare* on collagen metabolism in human skin fibroblasts. *Phytotherapy Research*, 21(5), 393–398.
- **Xue, Z., & Yang, B.** (2016). Phenylethanoid glycosides: Research advances in their phytochemistry, pharmacological activity and pharmacokinetics. *Molecules*, 21(8), 991.
- **Yondo, J., Komtangi, M.-C., Wabo, J. P., Bilong Bilong, C. F., Mpoame, M., & Kuiate, J.-R.** (2013). Nematicidal efficacy of methanol/methylene chloride extract of *Rauwolfia vomitoria* (Apocynaceae) on *Heligmosomoides bakeri* (Nematoda, Heligmosomatidae) parasite of the white mouse (*Mus musculus*).
- **Yousefi, K., Fathiazad, F., Soraya, H., Rameshrad, M., Maleki-Dizaji, N., & Garjani, A.** (2014). *Marrubium vulgare* L. methanolic extract inhibits inflammatory response and prevents cardiomyocyte fibrosis in isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. *BioImpacts*, 4(1), 21–27.
- **Yousefi, K., Hamedeyazdan, S., & Torbati, M.** (2016). Chromatographic fingerprint analysis of marrubiin in *Marrubium vulgare* L. via HPTLC technique. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(2), 131–136
- **Zaabat, N., Darbour, N., Bayet, C., Michalet, S., Doléans-Jordhem, A., Chelr-Ghedira, L., Akkal, S., & Dijoux-Franca, M. G.** (2010). Étude préliminaire de *Marrubium deserti* de Noé, une Lamiaceae endémique algérienne. *Pharmacognosie*, 8, 353–358.
- **Zarai, Z., Kadri, A., Chobba, I. B., et al.** (2011). The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in Health and Disease*, 10, 1–8.

Annexes

Annexes

Matériel analytique

Appareils :

- Balance de précision
- Hôte
- Evaporateur rotatif
- Spectrophotomètre
- Vortex
- Autoclave

Verrerie et petit matériel

- Spatule
- Erlenmeyer
- Becher
- Ballon
- Entonnoir
- Papier filtre wattman
- Eprouvettes
- Micropipettes
- Pompe pipette
- Pipette pasteur
- Boîtes de Pétri
- Anse de platine

Produits et réactif

- Dichlorométhane
- Méthanol
- Ethanol
- Eau distillée
- Chlorure de fer
- Folin-ciocalteu
- Magnésium
- Milieu Miller Hilton
- Bouillon nutritif
- FeCl_3

- Bicarbonate de sodium
- Acide gallique

Résumé

Résumé

Les métabolites secondaires présents dans les plantes ont des rôles variés et sont souvent utilisés en médecine pour leur effets thérapeutiques. L'objectif de ce travail est d'identifier et caractériser les métabolites secondaires ainsi que de tester l'activité antibactérienne des extraits de la plante *Marrubium vulgare*.

Dans un premier temps, nous avons obtenu trois extraits de *Marrubium vulgare* en utilisant des solvants à polarité croissante. Ensuite le screening phytochimique a été effectué afin d'évaluer qualitativement les métabolites secondaires, suivi par un dosage des phénols totaux permettant une appréciation quantitative. Et pour finir, nous avons testé l'activité antimicrobienne sur des souches à Gram positif et à Gram négatif.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait méthanolique est le plus riche en polyphénols, et que l'extrait dichlorométhanolique a montré une forte activité antibactérienne à l'égard de *Escherichia coli* et *Streptococcus*.

Mots clé : *Marrubium vulgare*, métabolites secondaires, activité antibactérienne, polyphénols, *Escherichia coli*, *Streptococcus*.

Abstract

Secondary metabolites present in plants have various roles and are often used in medicine for their therapeutic effects. The objective of this work is to identify and characterize secondary metabolites and to test the antibacterial activity of extracts of the plant *Marrubium vulgare*.

First, we obtained three extracts of *Marrubium vulgare* using solvents with increasing polarity. Then, the phytochemical screening was carried out in order to qualitatively evaluate secondary metabolites, followed by a total phenol dosage allowing a quantitative assessment. Finally, we tested the antimicrobial activity on Gram-positive and Gram-negative strains.

The results obtained showed that the methanolic extract is the richest in polyphenols, and that the dichloromethane extract showed strong antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Streptococcus*.

Keywords: *Marrubium vulgare*, secondary metabolites, antibacterial activity, polyphenols, *Escherichia coli*, *Streptococcus*.

الملخص

تلعب المركبات الثانوية الموجودة في النباتات أدوارًا متنوعة، وغالبًا ما تُستخدم في الطب من أجل تأثيراتها العلاجية. هدف هذا العمل هو تحديد وتصنيف المركبات الثانوية واختبار النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات نبات *Marrubium vulgare*.

في البداية، حصلنا على ثلاث مستخلصات من *Marrubium vulgare* باستخدام مذيبات ذات قطبية متزايدة. ثم تم إجراء الفحص الكيميائي النباتي من أجل التقييم النوعي للمركبات الثانوية، تلاه تحديد كمية الفينولات الكلية مما يسمح بالتقييم الكمي. وأخيرًا، قمنا باختبار النشاط المضاد للميكروبات على سلالات إيجابية وسلبية الغرام.

أظهرت النتائج أن المستخلص الميثانولي هو الأغنى بالبوليفينولات، وأن مستخلص ثنائي كلور الميثان أظهر نشاطًا مضادًا للبكتيريا قويًا تجاه *Escherichia coli* و *Streptococcus*.

الكلمات المفتاحية: *Marrubium vulgare* ، المركبات الثانوية، النشاط المضاد للبكتيريا، البوليفينولات،

Streptococcus. *Escherichia coli*

Année universitaire : 2024-2025	Présenté par : LEMBERBECHE HADJER & RASSOULI MERIEM YASMINE
Évaluation phytochimique et évaluation du potentiel antibactérien des extraits d'une plante médicinale : <i>Marrubium vulgare</i>	
Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Générale	
<p style="text-align: center;"><u>Résumé</u></p> <p>Les métabolites secondaires présents dans les plantes ont des rôles variés et sont souvent utilisés en médecine pour leur effets thérapeutique. L'objectif de ce travail est d'identifier et caractériser les métabolites secondaires ainsi que de tester l'activité antibactérienne des extraits de la plante <i>Marrubium vulgare</i>.</p> <p>Dans un premier temps, nous avons obtenu trois extraits de <i>Marrubium vulgare</i> en utilisant des solvants à polarité croissante. Ensuite le screening phytochimique a été effectué afin d'évaluer qualitativement les métabolites secondaires, suivi par un dosage des phénols totaux permettant une appréciation quantitative. Et pour finir, nous avons testé l'activité antimicrobienne sur des souches à Gram positif et à Gram négatif.</p> <p>Les résultats obtenus ont montré que l'extrait méthanolique est le plus riche en polyphénols, et que l'extrait dichlorométhanolique a montré une forte activité antibactérienne à l'égard de l'<i>Escherichia coli</i> et <i>Streptococcus Aureus</i>.</p>	
Mots-clés : <i>Marrubium vulgare</i> , métabolites secondaires, activité antibactérienne, polyphénols, <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus</i> .	
Laboratoires de recherche : Laboratoire de Biochimie Appliquée U Constantine 1 Frères Mentouri.	
Président du jury : Dr. TENIOU S. MCB – U Constantine 1, Frères Mentouri. Encadrant : Dr. DEMMAK R.G. MCA – U Constantine 3, Saleh Boubnider. Examineur : Dr. BOUDERSA N. MAB – U Constantine 1, Frères Mentouri.	
Date de soutenance : /06/2025	