

UNIVERSITÉ DE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

MÉMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biotechnologie Végétale

EXTRACTION, CARACTERISATION DE QUELQUES METABOLITES SECONDAIRES D'UNE PLANTE MEDICINALE, Marrube blanc (*Marrubium vulgare*) ET QUELQUES EFFETS BIOLOGIQUES

Présenté par

Chafika LARBI

Devant le jury composé de :

Mme F/Z. KARA TOUMI	Professeur, U de Blida 1	Présidente
Mr S. MEGATELI	Maître de Conférences A, U de Blida 1	Examinateur
Mme N. SMAIL SAADOUN	Professeur, U de Mouloud Mammeri	Examinatrice
Mme C. CHAOUIA	Maître de Conférences A, U de Blida1	Promotrice

Blida, Juillet 2017

RESUME

Le marrube blanc (*Marrubium vulgare*) est une plante à caractère thérapeutique certain, récolté en 2014, durant deux périodes (Végétation et Floraison) au niveau de la région de Djouab, la willaya de Média.

Un meilleur rendement a été obtenu en période de floraison en comparaison avec la période de végétation, où nous enregistrons respectivement 27,46% et 17,1%.

La caractérisation par la Chromatographie sur couche mince et Chromatographie à haute performance nous a permis de déduire que la plante est très riche en métabolites secondaires surtout en composés phénoliques notamment en acide gallique, quercétine, catéchine, vanilline, acide salysalique, acide coumarique, acide chlorogénique, acide tannique. Nous avons identifié pour la première fois la présence de la rutine au niveau des feuilles durant les deux périodes de récoltes de la région de Djouab, la willaya de Média.

Le dosage phytochimique révèle la présence de composés phénoliques à des concentrations différentes durant la période de la végétation à la floraison respectivement avec la présence des polyphénols totaux $168,606 \pm 5,19$ mg EAG/g MS et $192,678 \pm 6,60$ mg EAG /g MS, les flavonoïdes avec $0,280 \pm 0,00$ mg EQ/g MS et $0,633 \pm 0,00$ mg EQ/g MS et des tanins avec $3,938 \pm 0,85$ mg EC /g MS et $30,86 \pm 2,075$ mg EC /g MS.

L'extrait méthanolique en période de végétation a présenté une forte capacité à piéger les molécules du radical libre DPPH par rapport à l'extrait méthanolique en période de floraison avec des IC_{50} respectivement avec 0,35mg /ml et 0,42mg/ml.

L'étude de l'activité antimicrobienne a montré l'effet positif de l'extrait méthanolique sur les souches bactériennes à Gram (+) durant les deux périodes de récoltes. Un effet, négatif sur les bactéries à Gram (-) a été enregistré exception faite pour *Pseudomonas aeruginosa* en période de

floraison où la sensibilité était positive. L'effet antifongique est révélé négatif sur *Candida albicans* durant les deux périodes de récoltes.

Mots clés : *Marrubium vulgare*, végétation, floraison, métabolites secondaires, activités biologiques.

ABSTRACT

Marrubium vulgare (*Marrubium vulgare*) is a plant with a certain therapeutic character, harvested in 2014, during two periods (Vegetation and Flowering) in the region of Djouab, the province of Média.

A better performance was achieved during flowering in comparison with the vegetation period, where we record 27.46% and 17.1% respectively.

The characterization by layer chromatography and high performance chromatography allowed us to deduce allowed us to infer that the plant is very rich in secondary metabolites mainly composed phenolic including gallic acid, quercetin, catechin, vanillin, salysalique acid, coumaric acid, chlorogenic acid, tannic acid. We have found for the first time the presence of rutin.

The phytochemical assay reveals the presence of phenolic compounds at different concentrations during the growing season to flower respectively with the presence of total polyphenols 168.606 ± 5.19 mg EAG / g MS and $192.678 \pm 6,60$ mgEAG / g DM, flavonoids with $0.280 \pm 0,00$ mg EQ / g MS and $0,633$ mg $\pm 0,00$ EQ / g MS and tannins with 3.938 ± 0.85 mg CE / g and $30.86 \pm 2,075$ mg MS EC / MS g.

The methanol extract in growing period showed a strong ability to scavenge free radical molecules DPPH compared to the methanol extract during flowering with IC₅₀ respectively with 0,35mg / ml and 0,42mg / ml.

The study of antimicrobial activity showed the positive effect of the methanol extract of the bacterial strains Gram (+) during the two harvest periods. A negative effect on the Gram (-) was recorded exception made for *Pseudomonas aeruginosa* during flowering where sensitivity was positive. The antifungal effect was negative on *Candida albicans* during the two harvest periods.

Keywords: *Marrubium vulgare*, vegetation, flowering, secondary metabolites, methanol extract, Biological activities.

ملخص

المريوة (*Marrubium vulgare*) هي نبتة ذات خواص علاجية, حصدت في عام 2014، وخلال فترتين (أوراق الشجر والأزهار) في المنطقة Djouab ولاية المدية، قدمت الحصول على مردود جد عالي أثناء فترة الإزهار مقارنة مع فترة النمو وذلك على التوالي % 27,46 و % 17,1 .

بفضل استعمال التقنيات الحديثة و الدقيقة مثل الكروماتوغرافية السائلة و الكروماتوغرافية السائلة عالية الأداء اللوني استطعنا أن نتعرف على هذا النبات انه غني بالمركبات الثانوية التي تتكون أساسا من *acide gallique*, *quercétine*, *catéchine*, *vanilline*, *acide salysalique*, *acide coumarique*, *acide chlorogénique*, *acide tannique*. تم التعرف و لأول مرة على *rutine*.

التعيين المقدار الكميائي النباتي يكشف عن وجود مركبات فينولية ذات تراكيز مختلفة وهي البوليفينولات الكلية تقدر بـ $168,606 \pm 5,19$ mg و $192,678 \pm 6,60$ mgEAG /g MS و $0,280 \pm 0,00$ mg و $0,633 \text{mg} \pm 0,00$ EQ/g MS و الفلافونويد تقدر ب $0,280 \pm 0,00$ mg و $0,633 \text{mg} \pm 0,00$ EQ/g MS و في النهاية مادة الدباغ تقدر ب $30,86 \pm 2,075$ mg EC /g MS و $3,938 \pm 0,85$ mg EC /g MS et على التوالي من فترة النمو إلى فترة الإزهار.

أظهر مستخلص الميثانول في فترة النمو قدرة جد عالية على كس الجزيئات الحرة الراديكالية DPPH مقارنة مع مستخلص الميثانول خلال فترة الإزهار مع IC_{50} على التوالي مع $0,35$ ملغ / مل و $0,42$ ملغ / مل.

أظهرت دراسة النشاط البكتيري أثرا ايجابيا لمستخلص الميثانول على السلالات البكتيرية Gram(+) أثناء فترتي القطف. اثر سلبي تم تسجيله على السلالات Gram(-) باستثناء *Pseudomonas aeruginosa* التي كانت حساسة اتجاه مستخلص الميثانول في فترة الإزهار. تبين أن الأثر المضاد للفطريات انه سلبي على *Candida albicans* اثناء المرحلتين النمو و الإزهار.

كلمات المفتاح: *Marrubium vulgare*, فترة النمو, فترة الأزهار, المركبات الثانوية, مستخلص, الأنشطة البيولوجية.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Au premier lieu, je remercie le bon Dieu الله qui m'a donné la patience, la volonté et tout ce qu'il fallait pour pouvoir terminer ce travail.

Mes remerciements les plus distingués et chaleureux vont vers la directrice de thèse, M^{me} CHAOUA, pour sa gentillesse, le soutien de toute sorte et l'encouragement, qu'elle m'a accordé. Je tien MADAME à vous présenter ma profonde gratitude pour votre patience pendant la période de stage, et surtout le temps que vous m'avez consacré malgré toutes vos occupations.

A vous M^{me} SAIDI, j'adresse mes profonds remerciements pour avoir accepté de m'aider à améliorer ce travail et pour tous les conseils que vous m'avez donnés. J'adresse mes sincères remerciements pour m'avoir bien reçu au sein de votre laboratoire de Biotechnologies Végétale Environnement et Santé et fournis tous le nécessaire pour la réalisation de ce travail. Un grand merci.

Mes sincères remerciements vont également à tous les membres du jury, à la présidente du jury M^{me} KARA TOUMI, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury.

A vous, M^{me} MEGATELI, je vous présente mes sincères remerciements de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce mémoire malgré vos nombreuses tâches.

A vous, M^{me} SMAL SAADOUN, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de consacrer une partie de votre temps pour examiner ce travail.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements aux enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie. Mes sincères remerciements à M^{lle} Chabata, M^{me} Metidji, M^{lle} Hanay pour leur disponibilité et précieuse aide apportée en analyse d' HPLC et en Histologie Végétale, au niveau du laboratoire de recherche des plantes médicinales et aromatiques du département de biotechnologie végétale et je tiens à remercier M BOUTOUNI Maître de Conférence A en Chimie faculté de technologie université de Blida 1.

Je ne voudrais pas omettre de remercier mes camarades de promotion pour l'agréable ambiance qui a régné entre nous tout au long de la préparation du magister, et auxquels je souhaite beaucoup de succès et de bonheur.

J'adresse mes sincères remerciements à mes très chères collègues du travail, les ingénieurs de laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université de Blida 1, pour leur aide, leur soutiens pendant les moments difficiles, leur gentillesse. ; je citerai: FELLA, NAZHA, NESRINE, HOURIA, SABRINA, SIHAM, SALMA, HAMAT, ZAHRA, DALILA, FATTOUMA, HAMAT, AMINA, HADJAR, WAJAA, DJAMILA, ABDELRAHMEN. Un grand merci.

Mes sincères remerciements, ne vont à toute personne de près ou de loin qui m'a aidée par un seul mot pour m'encourager à réaliser ce travail, je vous dis merci.

Dédicace

Je dédie ce travail à ceux qui ont toujours été près de moi, qui m'ont entouré de leur affection et de leur tendresse:

A la mémoire de ma mère

A la lumière de mes yeux, mon père

Je dédie ce travail à ma très chère fille, L'IMANOUR ELARIQ pour son soutien et son aide précieuse tout au long de ce travail.

A mes frères, sœurs, ma belle mère et mon mari dont la tendresse et la compréhension ont été d'un grand soutien moral, sans oublier ma petite sœur FOUZIA

A mes beaux frères, mes belles sœurs.

A mes neveux : ABD ELHADJ, ABD ELRAHMAN, ISLAM, MONSIF, ABD ELLAH, AMYM, ABO BAKER, SAAD, MOHAMMED, KARIM et ABD ELQALIL

A mes nièces : MERIEM, ALAA, AMEL, MALAK, ANA, HIBA, AMIRA, HADJAR, KHADIDJA.

Chafika

LISTE DES FIGURES ET DESTABLEAUX

Figure.1.1 : Structure générale du noyau des flavonoïdes	20
Figure.1.2 : Tanin catéchique	22
Figure.1.3 : Structures des acides hydroxybenzoïques et Hydroxycinnamiques.....	23
Figure 2.1 : Vue générale de l'espèce <i>Marrubium vulgare</i>	35
Figure 2.2: <i>Marrubium vulgare</i> en période de végétation (février 2014).....	36
Figure 2.3: <i>Marrubium vulgare</i> en période de floraison (mai 2014)	36
Figure 2.4 : Localisation géographique de la zone d'étude.....	37
Figure 2.5: Description d'un extracteur de Soxhlet	44
Figure 2.6 : Protocole expérimental d'extraction des composés phénoliques par Soxhlet	45
Figure 2.7 : Chromatographie sur couche mince	46
Figure 2.8: Transformation du DPPH de la forme active à la forme inactive.....	51
Figure 3.1: Vue d'une partie de la tige	56
Figure 3.2 : Vue d'un pétiole entouré de poils épidermiques	57
Figure 3.3 : Vue d'un limbe	57
Figure 3.4: Morphologie foliaire en période de végétation.....	58
Figure 3.5 : Morphologie foliaire en période de floraison.....	58
Figure 3.6 : Vue d'une feuille à nervations penné	58
Figure 3.7 : Disposition de la fleur par rapport à la tige	59

Figure 3.8 : Description de la fleur.....	60
Figure 3.9 : Corolle tubuleuse	61
Figure 3.10 : Description de l’ovaire	62
Figure 3.11 : Clive à dix dents recouvrant de poils épidermiques sur les faces.....	62
Figure 3.12 : Vue des graines.....	62
Figure 3.13 : Coupe transversale d’une feuille	63
Figure 3.14: Coupe transversale de la feuille au niveau de la nervure Principal.....	64
Figure 3. 15 : Coupe transversale de la feuille au niveau du pétiole	64
Figure 3.16 : Coupe transversal d’une tige de <i>Marrubium vulgare</i>	65
Figure 3.17 : Coupe transversal d’une tige de <i>Marrubium vulgare</i> à l’état vital.....	66
Figure 3.18 : Teneur en eau de <i>Marrubium vulgare</i> en période de végétation.....	67
Figure 3. 19 : Teneur en eau de <i>Marrubium vulgare</i> en période de floraison...	67
Figure 3. 20 : Taux de cendres de <i>Marrubium vulgare</i> (Période de végétation).....	69
Figure 3. 21 : Taux de cendres de <i>Marrubium vulgare</i> (Période de floraison).....	69
Figure 3.22 : Rendement de l’extrait méthanolique.....	73
Figure 3.23. Plaque de CCM prise après révélation à la lumière UV (318 nm) pour les extraits et les témoins.....	75

Figure 3.24: Chromatogramme HPLC de l'extrait méthanolique de <i>Marrubium vulgare</i> en période de végétation.....	77
Figure 3.25 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique de <i>Marrubium vulgare</i> en période de floraison.....	80
Figure 3.26 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques	83
Figure 3.27 : Teneur des composés phénoliques en deux périodes	83
Figure 3.28 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	86
Figure 3.29 : Teneur en flavonoïdes en deux périodes	86
Figure 3.30 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins.....	88
Figure 3.31: Teneur en tanins condensés en deux périodes.....	88
Figure 3. 32 : Pourcentage d'inhibition du radicale libre en fonction de la concentration de l'EMOHv.....	90
Figure 3.33 : Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction de la concentration de l'EMOHf.....	91
Figure 3.34 : Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction de la concentration de la Rutine.....	92
Figure 3.35 : Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction de la concentration de l'α tocophérol.....	93

Figure 3.36 : Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction de la concentration de quercétine.....	93
Figure 3.37 : Détermination statistique de la moyenne d'IC ₅₀ ±écart type	96
Figure 3.38 : IC ₅₀ des extraits et les standards.....	98
Figure 3.39 : Activité antimicrobienne des souches utilisées vis-à-vis EMOHv.....	101
Figure 3.40 : Zone d'inhibition de <i>Entérocooccus faecalis</i> et <i>Micrococcus luteus</i>	102
Figure 3.41 : Activité antimicrobienne des souches utilisées vis-à-vis EM0Hf.....	103
Figure 3.42 : Zone d'inhibition de <i>S.epidermidis</i>	104
Figure 3.43 : Comparaison de l'activité antimicrobienne de deux extraits méthanolique.....	105
Tableau 1.1 : Activités biologiques du <i>Marrubium vulgare</i>	16
Tableau 1.2 : Principales classes de composés phénoliques	18
Tableau 1.3 : Activités biologiques des composés phénoliques.....	21
Tableau1.4 : Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe	22
Tableau 2.1: Conditions opératoires de HPLC-DAD.....	52
Tableau.2.2 : Souches bactériennes utilisées.....	53
Tableau 2.3: Degré de sensibilité des souches microbiennes selon le diamètre de la zone d'inhibition.....	55

Tableau 3.1: Teneur en eau chez <i>Marrubium vulgare</i>	67
Tableau 3.2 : Teneur en humidité de la plante.....	68
Tableau 3.3 : Teneur en cendres de <i>Marrubium vulgare</i> en deux périodes.....	70
Tableau 3.4 : Caractérisation phytochimique de <i>M.vulgare</i>	71
Tableau 3.5 : Aspect, couleur et rendement de extrait méthanolique de <i>Marrubium vulgare</i>	72
Tableau 3.6 : Chromatographie sur couche mince des témoins.....	75
Tableau 3.7 : Chromatographie sur couche mince des EMOH en deux périodes.....	76
Tableau 3.8 : Temps de rétention pour les étalonnages.....	78
Tableau 3.9 : Temps de rétention des composés phénoliques de <i>M. vulgare</i> en période de végétation.....	78
Tableau 3.10 : Temps de rétention des composés phénoliques de <i>M. vulgare</i> en période de végétation.....	81
Tableau 3.11: Activité antimicrobienne des testes.....	100

INTRODUCTION

L'homme utilise depuis des millénaires les plantes médicinales pour traiter les maladies. Actuellement, l'usage de la médecine traditionnelle est très répandu et revêt une importance sanitaire et économique croissante [138].

Les plantes médicinales représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études

La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques sont toujours à la recherche de nouveaux composés actifs, se tournent de plus en plus vers l'identification et la caractérisation de molécules issues de matrices naturelles et s'inspirent de leur structure moléculaire pour fabriquer de nouveaux médicaments [93], [17].

L'Algérie, de part sa position géographique, présente une large gamme d'étages bioclimatiques, induisant une biodiversité de plantes. Parmi elle, un nombre assez important est à caractère thérapeutique [14], [19]. Dans ce contexte s'inscrit notre travail, où nous nous sommes intéressés à une espèce appartenant au genre *Marrubium*: *Marrubium vulgare* originaire de la région de Djouab, la wilaya de Médéa.

L'objectif de notre recherche est la caractérisation de quelques métabolites secondaires, notamment les constituants naturels tels que les composés phénoliques. Ces derniers sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé.

Pour cela, notre étude vise:

- ✚ Description, et identification botanique du *Marrubium vulgare*.
- ✚ Etude phytochimique du *Marrubium vulgare* par l'extraction, l'analyse de ses composés chimiques actifs par Chromatographie sur couche mince, Chromatographie à haute performance et spectrophotométrie UV-Visible durant les deux périodes de récoltes (Végétation et floraison).
- ✚ Evaluation du pouvoir antioxydant de *Marrubium vulgare* durant les deux périodes de récolte par la méthode du DPPH.
- ✚ Etude biologique portant sur l'effet antimicrobien de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* durant les deux périodes de récolte in vitro vis-à-vis des souches microbiennes de référence.

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Plantes médicinales

Les vertus médicinales des plantes sont reconnues dans le monde entier depuis des millénaires. Les plantes médicinales étaient utilisées aussi bien dans la Chine impériale que dans l'ancienne Egypte [1].

Près de 2000 ans avant Jésus Christ, le roi assyrien HAMMOURABI encourageait la culture des plantes médicinales [2].

Une plante est dite médicinale lorsqu'au moins une partie d'elle possède des propriétés médicamenteuses, car elle renferme des principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies [6].

1.1.1. Phytothérapie

La phytothérapie est le traitement des pathologies par les plantes médicinales ; celles-ci sont consommées en l'état (tisanes) ou après une simple transformation (poudre, extrait, teinture) [4].

On peut distinguer deux types de phytothérapie [5] :

- Une pratique ancienne dite médecine traditionnelle, basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement, cette phytothérapie est encore massivement employée dans certains pays dont ceux en voie de développement.
- Une pratique basée sur les avancées scientifiques et la recherche des principes actifs des plantes. Cette phytothérapie est assimilée aux médicaments, on parle alors de pharmacognosie

1.1.2. Récolte des plantes médicinales

Le choix de l'époque de la récolte dépend de la nature de l'organe récolté et des variations du taux des principes actifs en fonction de la période de végétation. La composition chimique varie selon le cycle végétatif et reproducteur de la plante [7].

Ces variations peuvent être quantitatives (la teneur en principe actif passe par un maximum et décroît ensuite), ou qualitatives (apparition d'un principe actif et disparition d'un autre au cours du développement de la plante).

Les plantes médicinales doivent être cueillies lorsque la teneur en matière active est la plus forte. La cueillette se fait en début de matinée après le levé du soleil, par temps sec après avoir attendu l'évaporation de la rosée [7]. On récolte les feuilles au moment de leur plein développement, mais avant la formation des boutons floraux, qui diminueraient leur teneurs en principes actifs.

La cueillette des fleurs se fait juste avant l'épanouissement complet et avant la fécondation. Les sommités fleuries se cueillent au début de l'épanouissement des fleurs [8].

1.1.3. Séchage et conservation des plantes médicinales

Avant de dessécher les plantes, il faut les débarrasser de toutes substances étrangères, des fragments desséchés ou altérés [8].

Le séchage se fait à l'abri de la poussière et de l'humidité, dans un endroit ombré et bien aéré, car les rayons solaires causent une altération des matières actives. Après séchage, elles doivent être conservées à sec et à l'obscurité, dans des récipients fermés, des boîtes en carton, des sacs en papier Kraft ou dans des boîtes en bois [9], [8].

Une plante médicinale mal conservée perd en partie sa valeur thérapeutique [10].

1.1.4. Mode d'extraction et préparation des plantes médicinales

Certaines plantes renferment toute une gamme de métabolites actifs et peuvent avoir des effets très différents en fonction de leur mode de préparation [11]. Il existe en effet de nombreuses façons de les utiliser (fraîches ou séchées), pour un usage interne ou externe, traitées ou non.

On peut utiliser une plante seule ou un mélange de plusieurs de celle-ci, parfois même des plantes combinées avec d'autres préparations naturelles [9]. Ainsi, les plantes peuvent être préparées en infusion, en décoction, en macération, en poudre, en cataplasme et/ou en teinture.

1.1.4.1. Infusion

Solution obtenue en soumettant pendant quelques minutes, une plante à l'action de l'eau bouillante (de 5 à 15 minutes, selon les organes de la plante).

L'infusion s'utilise pour les substances fragiles pouvant être détruites par une température trop prolongée ou éliminées par la vapeur [12].

1.1.4.2. Décoction

Solution obtenue par ébullition prolongée d'une plante. On met la plante dans l'eau froide, on fait bouillir, selon les cas, de 2 à 15 minutes. Les écorces et les racines sont bouillies plus longtemps car ces structures libèrent difficilement leurs principes actifs lors d'une infusion que les tiges et les feuilles [13], [8].

1.1.4.3. Macération

Le principe de la macération est de laisser la plante (sèche ou fraîche) au contact de l'eau froide, l'huile, du vin, ou dans de l'alcool à froid pendant quelques heures, voire quelques jours, cette méthode d'extraction permet l'obtention d'une solution plus concentrée riche en principes actifs [14].

Elle est employée surtout pour des substances trop facilement transformables par la chaleur [15].

1.1.4.4. Cataplasme

Il se constitue d'une bouillie assez épaisse que l'on dispose entre deux linges et que l'on applique sur la peau à l'endroit voulu. Le cataplasme produit des actions déterminées : révulsive, circulatoire et adoucissante [15].

Si l'on emploie des herbes fraîches, celles-ci doivent être propres ; on les pétrit, on les malaxe, puis on les enveloppe dans un tissu très fin avant de les poser sur la peau. Si l'on emploie des herbes sèches, il faut les envelopper également d'un morceau d'étoffe très fin ; les tremper dans de l'eau chaude, presser l'étoffe pour égoutter et appliquer sur la zone touchée. Laisser agir quelques minutes [14].

1.1.4.5. Poudre

On obtient cette préparation en pilant au mortier une certaine quantité de drogue desséchée. La poudre obtenue sera dissoute dans un liquide ou

mélangée avec certains aliments tels que le miel ou de la confiture. La poudre est utilisée seule ou en mélange. Elle est vendue en sachets (infusettes) pour en faire des tisanes [8], [16].

1.1.4.6. Teintures

La teinture est obtenue en laissant les plantes macérer dans de l'alcool puis en pressant et en filtrant le mélange.

C'est la méthode la plus utilisée pour obtenir une action immédiate des principes actifs de la plante sur les organes affectés [14].

1.2. Généralités sur la plante

1.2.1. Famille des Lamiacées

C'est une famille d'une grande importance aussi bien pour son utilisation en industrie alimentaire et en parfumerie qu'en thérapie. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant [17].

La famille des Lamiacées ou Labiées, signifié "labié" en référence aux pétales des fleurs à la forme de lèvres. Les Lamiacées constituent une large famille de plantes Dicotylédones qui comprend environ 7200 espèces et près de 236 genres. Ce sont le plus souvent des plantes herbacées, des arbustes et très rarement des arbres, largement répandus autour du monde mais particulièrement dans les régions tempérées et méditerranéennes [20].

1.2.2. Genre *Marrubium*

1.2.2.1. Distribution

Le genre *Marrubium* appartient à la famille des Lamiacées, comprenant plus de 30 espèces différentes, largement distribués dans les régions d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie (Appendice A, tableau 1) [21].

En Algérie, on retrouve 6 espèces différentes au sein de ce même genre : *Marrubium vulgare*, *Marrubium supinum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssoides* Pomel et *Marrubium déserti* de Noé [19].

1.2.3. Espèce *Marrubium vulgare*

1.2.3.1. Description

C'est une plante vivace, de 30 à 80 cm de hauteur, à odeur forte et désagréable, les tiges sont simples ou ramifiées, épaisses, cotonneuses, très feuillées. Les feuilles sont opposées, ont toutes un pétiole ; ce dernier est très allongé chez les feuilles inférieures, au contraire très court et bordé par deux prolongements du limbe chez les feuilles supérieures; le limbe est fortement ridé en réseau, irrégulièrement crénelé, à contour largement ovale ou arrondi, se rétrécissant en coin à sa base, velu-cotonneux et blanchâtre sur la face inférieure, mais vert. Les inflorescences sont en glomérules verticillés. Les bractées sont linéaires aigues. Les fleurs sont petites, blanchâtres, la corolle possède deux lèvres, la lèvre inférieure est trilobée et la supérieure possède deux lobes. Les 4 étamines sont renfermées dans le tube de la corolle. Le calice est velu à 10 dents courtes et crochues. Enfin, quatre petits akènes sont cachés à la base du calice.[19],[21].

1.2.3.2. Habitat

Le marrube blanc se rencontre à l'état spontané en bordure de chemins, sur des pentes arides ou dans les friches .C'est une plante rustique qui préfère être en plein soleil et dans un sol bien drainé, même pauvre et sec. On récolte ses feuilles au printemps (Appendice A, figure 1) [22].

1.2.3.3. Systematique

Selon Judd et al [23], la position systématique de l'espèce *Marrubium vulgare* est:

Embranchement	Angiosperme
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Marrubium</i>
Espèce	<i>Marrubium vulgare</i>

1.2.3.4. Noms vernaculaire communs

Algérie : Marriouth [19], elle dite en Berbère; Berriut [41].

Anglais : Horehound [21].

Français : Marrube blanc ; herbe vierge [19].

1.2.3.5. Composition chimique

La partie aérienne du marrube blanc contient plusieurs métabolites secondaires. Le principal métabolite de cette plante a été identifié en tant que marrubiine, c'est un diterpène labdane furanique et la présence du pérégrinol, du vulgarol, du marrubénol et du marrubiol [26].

D'autres composés sont présents dans la plante, parmi lesquels on peut citer les flavonoïdes (quercétine, l'apigénine, lutéoline...), les tannins (l'acide gallique), des dérivés de l'acide hydroxycinnamique (Acide chlorogénique, caféique, caféylquinique, ainsi que plusieurs phenylpropanoïdes esters tels que les forsytoside, arenarioside, ballotetroside, alyssonnoïde, verbascosides

(actéosides), des huiles essentielles comportant différents composés monoterpéniques (α -pinène, camphène, limonène...). La plante est aussi caractérisée par la présence d'autres composés tels que alcaloïdes (stachydrine, bétonicine), sels minéraux, stéroïdes [24],[25],[26],[27],[28],[14],[29].

1.2.3.6. Utilisations de la plante

Les vertus médicinales du marrube blanc sont connues et utilisées depuis l'antiquité pour soigner la toux et était prescrit contre les morsures d'animaux enragés. Le marrube soigne aussi les troubles digestifs et les problèmes respiratoires comme expectorant, antispasmodique, antidiabétique, diurétique, et en cas d'infections respiratoires. Il est aussi employé pour combattre la cellulite et l'obésité [14]. La plante est également utilisée en usage externe, en cataplasme sur les tempes contre la fièvre, et sur les abcès et les furoncles pour les panser et aider à leur cicatrisation.

En usage interne, elle a un effet bénéfique en cas de rhume, de grippe, d'irritabilité, d'insomnie et de règles difficiles [30], [31].

1.2.3.7. Activités thérapeutiques

Plusieurs de ces utilisations traditionnelles ont été confirmées par des essais scientifiques, représentés dans le tableau 1.1

Tableau 1.1: Activités biologiques du *Marrubium vulgare*

L'espèce	L'activité	L'auteur
<i>Marrubium vulgare</i>	Antidiabétique	[24]
	Antibactériens, Antifongiques	[115], [18]
	Antiulcéreux (gastroprotectrice)	[28]
	Antioxydante	[32], [29], [33]
	Hépatoprotectrice	[34]
	Hémostatique	[26]

1.3. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes, synthétisés et accumulés en petites quantités par les plantes autotrophes. On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties de la plante, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes on distingue : Les composés phénoliques, les terpènes, les alcaloïdes [35].

1.3.1. Principales familles de métabolites secondaires

1.3.1.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules spécifiques naturelles largement répandus, avec plus de 8000 structures phénoliques connus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé [36], [37].

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside) ;

Les composés phénoliques sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs, racine, tiges, feuilles, fleurs et fruits [38], [3].

Les principales classes de composants phénoliques sont : les flavonoïdes, tanins, coumarines, acides phénoliques (Tableau1.2).

Tableau1.2: Principales classes de composés phénoliques [47]

Squelette carboné	Classe	Exemple
C ₆	Phénols simples	Catéchol
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acide caféique Scopolétine
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine Daidzéine
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorézinol
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	-
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	-

Les composés phénoliques sont en effet des éléments importants de qualité sensorielles (couleur, astringence) et nutritionnelles des végétaux que consomme l'homme et leur intervention dans la santé est maintenant reconnus dans des domaines variés ; lutte contre l'athérosclérose, action anti cancérigène pour certains d'entre eux, action antioxydant permettant de lutter contre le vieillissement cellulaire (Tableau.1.3) [47].

Tableau 1.3: Activités biologiques des composés phénoliques

Polyphenols	Activités	Auteurs
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes	[52]
	Antifongiques	[53]
	Antioxydants	[48]
Coumarines	Protectrices vasculaires et Antioedémateuses	[54]
Flavonoïdes	Antitumorales,	[43]
	Cardioprotecteurs	
	Anti-inflammatoires,	[3], [6]
	Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes	[18]
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux	[99]
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le Collagène	[80], [47]
	Antifongiques	[28]
	Anti-inflammatoires	[45]
Tanins	Antioxydantes	[3]

1.3. 1.1.1. Principales classes des composés phénoliques

a. Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes [39]. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules (Tableau1.4), où plus de 6500 structures ont été identifiées [40].

Ce sont des composés phénoliques ayant une structure de base en C₆-C₃-C₆, constituée de deux noyaux aromatiques, reliés par un hétérocycle oxygéné (Figure 1.1) [79].

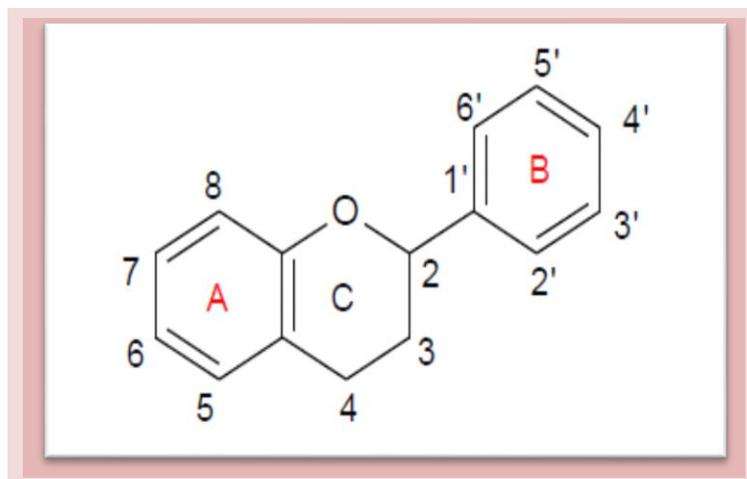
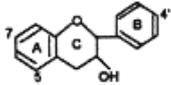
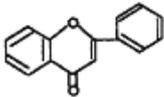
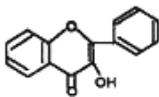
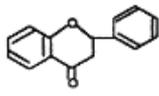
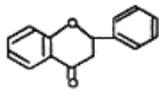
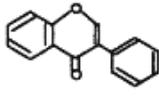
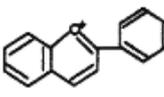


Figure 1.1 : Structure générale du noyau des flavonoïdes [79].

Les flavonoïdes existent soit à l'état libre (dans ce cas ils sont dits aglycones ou génines), ils sont présents dans les zones lipophiles, comme les glandes (à sécrétion) huileuses ou les couches de cire. Quant à leurs aglycones O-méthylés on les trouve dans le cytoplasme, soit sous forme de C-glycosides ou O-glycosides, ce qui tend à les rendre hydrosolubles (ils sont alors liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, le plus souvent aux positions 3 et 7). Ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères, ils se trouvent principalement dans les vacuoles [137].

Les flavonoïdes sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet [3].

Tableau1.4: Structure chimique de certains flavonoïdes

Classe	structure générale	flavonoïdes typiques	Substituants
Flavanol		(+)-catechin (-)-epicatechin Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate
Flavone		chrysin apigenin rutin luteolin luteolin glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinoses 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7-glucose
Flavonol		kaempferol quercetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH
Flavanone (dihydroflavon)		myricetin tamarixetin	3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe
Flavanone (dihydroflavon)		naringin naringenin taxifolin eriodictyol hesperidin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinoses
Isoflavone		genistin genistein daidzin daidzein	5,4'-OH, 7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7,4'-OH
Anthocyanidin		apigenidin cyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe

La majorité des activités biologiques des flavonoïdes est due à leur pouvoir antioxydant. Plusieurs études ont montré qu'un régime alimentaire riche en flavonoïdes peut avoir des effets bénéfiques sur la santé (Appendice A, figure 2) grâce à leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL, les flavonoïdes ont démontré des effets cardioprotecteurs importants [43].

b. Tanins

Les tanins sont des substances d'origine organique que l'on trouve dans pratiquement tous les végétaux et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles et fruits). On les rencontre dans les vacuoles des cellules, souvent combinés à d'autres substances, les alcaloïdes, protéines et oses, avec un poids moléculaire élevé [2]. Ils sont caractérisés par leur astringence [44].

On distingue en général deux groupes de tanins qui diffèrent entre eux par leur structure : les tanins hydrolysables et les tanins condensés [3].

✚ Tanins hydrolysables

Ce sont des polyesters d'un sucre, composés par un noyau central de glucose sur lequel se fixent, au moyen d'une liaison ester, des acides phénoliques : l'acide gallique pour le groupe des gallotanins, l'acide ellagique pour le groupe des ellagitanins. Leur hydrolyse, par des acides, des bases ou certaines enzymes, libère le glucose ainsi que les acides galliques ou phénoliques [45].

✚ Tanins condensés ou catéchiques ou proanthocyanidines

Les tanins les plus largement rencontrés dans les plantes vasculaires, (dicotylédones gymnospermes). Les tanins catéchiques se différencient des tanins hydrolysables par l'absence de sucre dans leur molécule, et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Ce sont des polymères de flavan-3-oles (Catéchine) (Figure 1.2) [3], [46].

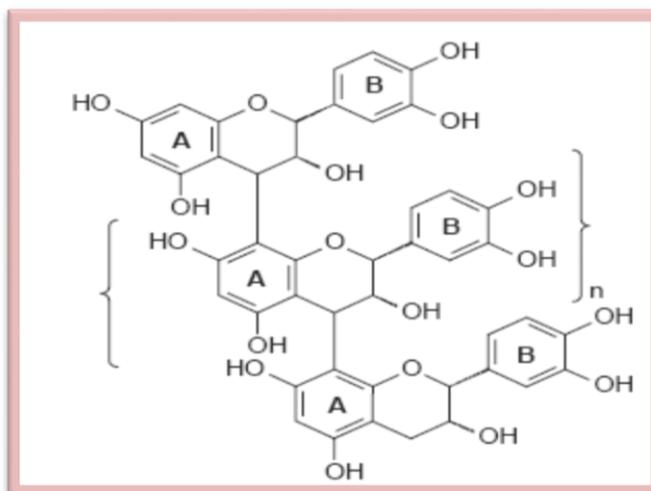


Figure 1.2 : Tanin catéchique [47]

Ils ont un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. En limitant les pertes en fluide et en prévenant les agressions externes. Les tanins stimulent la régénération des tissus en cas de brûlure ou de blessure superficielle. Ce sont des anti-diarrhéiques. Ils présentent une activité antiseptique et ont également une activité antioxydante [3].

c. Acides phénoliques

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils appartiennent à deux groupes [47].

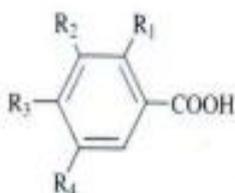
✚ Acides hydroxybenzoïques

Ce sont des acides phénols en C6-C1, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, très communs aussi bien sous forme libre que combiné à l'état d'ester ou hétéroside, et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certain tanins (Figure1.3).

✚ Acides hydroxycinnamiques

Ils représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3), dérivés hydroxylés de l'acide cinnamique (Figure1.3).

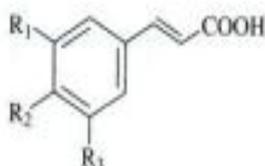
Acides hydroxybenzoïques



$R_1=R_2=R_3=R_4=H$
 $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$
 $R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$
 $R_1=R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH$
 $R_1=H, R_2=R_3=R_4=OH$
 $R_1=H, R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH$
 $R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$
 $R_1=R_4=OH, R_2=R_3=H$

acide benzoïque (non phénolique)
 acide *p*-hydroxybenzoïque
 acide protocatéchique
 acide vanillique
 acide gallique
 acide syringique
 acide salicylique
 acide gentisique

Acides hydroxycinnamiques (« phénylpropanoïdes »)



$R_1=R_2=R_3=H$
 $R_1=R_3=H, R_2=OH$
 $R_1=R_2=OH, R_3=H$
 $R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H$
 $R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH$

acide cinnamique (non phénolique)
 acide *p*-coumarique
 acide caféique
 acide férulique
 acide sinapique

Figure1.3 : Structures des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques

L'intérêt thérapeutique des acides phénols est antibactérien, antifongique [49] et antioxydant [48].

d. Coumarines

Pour la première fois, la coumarine fut isolée de la fève tonka (*Coumarouna odorata*). Depuis, environ un millier de molécules ont été isolés et caractérisés. Généralement, ils se présentent sous forme d'hétérosides [50].

Les coumarines sont efficaces contre les bactéries à Gram (+) [148], ils peuvent contribuer à fluidifier le sang, soigner les affections cutanées. Ce sont de puissants vasodilatateurs [51].

1.3.1.2. Saponines

Les saponines constituent une importante classe de métabolites secondaires d'origines végétale et animale, se sont des hétérosides complexes appartenant aux terpènes cycliques ou aux stéroïdes [141].

Elles sont connues pour leurs propriétés hémolytiques, antifongiques et antibactériennes, ce qui font d'elles des agents protecteurs des plantes contre les germes [142].

Certaines sont cytotoxiques et agissent comme des agents de lutte contre le cancer *in vivo*. De nombreuses saponines sont spermicides, elles peuvent être toxiques pour les animaux à sang froid particulièrement pour les poissons. De nombreuses plantes utilisées pour leur effet anti-inflammatoire et dermatologique doivent leurs propriétés aux saponines. Elles sont aussi antitussives, antalgiques et immuno-régulatrices [3].

1.3.1.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes présentent un groupe diversifié de substances organiques azotés d'origine végétale, à caractère alcalin, de faibles poids moléculaires et présentant des structures complexes.

La plupart des alcaloïdes sont issus des acides aminés et se trouvent dans environ 20% des espèces végétales. Comme métabolites secondaires, les alcaloïdes sont supposés jouer un rôle défensif dans la plante contre les prédateurs et à un degré moindre contre les bactéries, les champignons et les virus. En raison de leurs activités physiologiques et pharmacologiques remarquables, environ 12000 alcaloïdes connus, ont été exploités en tant que produits pharmaceutiques, stimulants, narcotiques et comme poisons [143].

1.4. Activités biologiques

1.4.1. Activités antioxydants

Il existe de nos jours un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement cellulaires tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire [68].

1.4.1.1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants, il conduit à des dégâts structuraux et fonctionnels [69].

1.4.1.2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense dans les circonstances normales. Mais sous l'action de différents facteurs comme, carences nutritionnelles (vitamines, oligo-éléments) et anomalies génétiques, de radiations ionisantes, de rayons UV, de métaux de transition ou au cours de réactions enzymatiques, plusieurs espèces beaucoup plus réactives sont produites, qui vont être nocive sur la santé de l'être humain.

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant un électron non apparié sur son orbitale externe. L'ensemble des radicaux libres et leurs précurseurs sont souvent appelés espèces réactifs à l'oxygène (ERO) [70], [145].

1.4.1.2.1. Principaux radicaux libres

✓ Anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) : est issu de la réaction de l'oxygène avec un électron, souvent au niveau de la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale (l'électron est alors transféré par l'intermédiaire d'un radical semiubiquinone) ou au cours de la lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus.

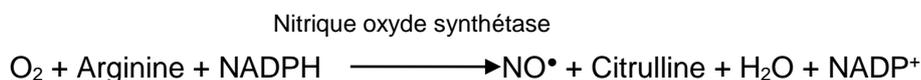
✓ Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) : provient d'une réaction entre deux anions superoxyde qui met fin au processus radicalaire. Il s'agit d'un oxydant beaucoup moins puissant, mais on considère qu'il joue avec ce dernier un rôle important dans le stress oxydatif, car les peroxydes d'hydrogènes diffusent facilement à travers les membranes vers des organites vulnérables des cellules comme le noyau ou mitochondrie.

✓ Hydroxyde (HO^{\bullet}) : est le produit de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec des ions métalliques comme par exemple Fe^{+2} (réaction de Fenton). C'est l'espèce chimique la plus réactive et elle joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique.



✓ L'oxygène singulet : est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Il est à l'origine du vieillissement cutané, de la cataracte, de la dégénérescence musculaire liée à l'âge et certains cancers de la peau.

✓ Le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) : est produit par l'un des atomes N terminaux de la L-arginine, cette réaction est catalysée par la nitrique oxyde synthétase (NOS) selon la réaction suivante :



Cette production est physiologique et joue un rôle majeur dans la neurotransmission, régulation de la pression sanguine, mécanisme de défense, relaxation des muscles lisses, régulation immunitaire. Mais à forte concentration, le NO devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec le ($O^{\bullet-}$) pour former un puissant oxydant le peroxy-nitrite ($ONOO^-$) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le (NO_2) et le (HO^{\bullet}), très néfaste pour les protéines et les gènes, il est impliqué dans l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, la polyarthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires chroniques intestinales comme la maladie de Crohn [71], [47], [72],[70], [73].

1.4.1.2.2. Maladies liées aux radicaux libres

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète [74], [75].

1.4.1.3. Système antioxydant

L'organisme développe des systèmes de défense très efficaces contre la production des radicaux libres ; Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme «antioxydant». Du point de vue biologique, les antioxydants sont des substances qui présentent à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat et dont les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques et ne branchent pas la réaction radicalaire [76]. On distingue au moins cinq modes d'interaction des antioxydants [47] ;

- Interruption de la chaîne de propagation des réactions radicalaires
- Chélation des métaux de transition.
- Désactivation des espèces oxygène réactive.

- Inhibition de l'activité des enzymes de peroxydation.
- Abaissement de la pression partielle en oxygène.

1.4.1.3.1. Origine des antioxydants

- Antioxydants endogènes

Les hommes et les animaux ont développé des systèmes de défense contre ces agressions par des enzymes de détoxification (Superoxyde dismutase (SOD), Catalase, Glutathion peroxydase, glutathion réductase) ou des protéines élaborées en présence de certains minéraux (fer, cuivre) [47].

- Antioxydants exogènes (naturels)

Les végétaux pouvant donner lieu à une exploitation comme source d'antioxydants à usage alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique.

Les principaux antioxydants naturels sont l'acide ascorbique, la vitamine E, le β - carotène et les composés phénoliques :

Vitamine E : terme général rassemble les α . δ . β . γ tocophérols. Les tocophérols sont des bons antioxydants alimentaires mais surtout leur rôle physiologique chez l'homme, comme protecteur des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le stress oxydant, est très important.

Elle constitue la première défense contre l'athérosclérose et en fait un protecteur cardiovasculaire majeur. Les tocophérols peuvent aussi agir en désactivant l'oxygène singulet.

La vitamine E est présente dans les huiles végétales (huiles d'arachide, de soja, de tournesol et d'olive pressées à froid) ainsi que dans les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs, et les légumes à feuilles vertes [70].

Vitamine C (acide ascorbique): est un puissant réducteur et joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E (L' α tocophérol agit dans l'organisme en synergie avec la vitamine C qui le régénère). L'association de ces deux antioxydants avec le β - carotène, pour lutte contre certaines formes de cancer fait l'objet d'études épidémiologiques. On retrouve la vitamine C

principalement dans les aliments suivants : les légumes, le chou, le poivron, le persil, les agrumes et le kiwi [47], [70], [78].

β -carotène (provitamine A) : possède la capacité de capter l'oxygène singulet. Diffusant mieux que les tocophérols dans les lipides, protège les graisses profonds. On le retrouve dans les légumes verts, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, les épinards, la papaye et autres fruits jaune [70], [77].

Composés phénoliques : Les composés phénoliques n'ont pas la même efficacité antioxydante, peuvent aussi inhiber les oxydations de façon indirecte, en désactivant l'oxygène singulet, oxydant très puissant des acide gras insaturés, ou en chélation les métaux de transition (Fe^{+2} , Cu^{+}), certains enfin sont des inhibiteurs des enzymes d'oxydation, en particulier de la lipoxygénase ou de la cyclo-oxygénase.

Les flavonoïdes agissent principalement comme antioxydants, en stabilisant les radicaux peroxydiques, mais ils peuvent aussi désactiver les espèces oxygénées réactives comme l'ion superoxyde, le radical $\text{OH}\cdot$, ou l'oxygène singulet, inhiber la lipoxygénase ou encore chélater les métaux. Ils jouent un rôle très important dans le traitement des inflammations, des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension, des thromboses, des allergies et des affections bactériennes. On les retrouve dans les fruits, les légumes, le thé et le vin. Les flavonols sont les plus efficaces de tous les flavonoïdes [47], [70].

1.4.2. Activité antimicrobienne

Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les microorganismes résistant aux antibiotiques. Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des micro-organismes ou des plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles [55].

1.4.2.1. Bactéries à Grams positifs

1.4.2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Appelé aussi staphylocoque doré, aéro-anaérobie facultatif, s'assemblent en forme d'une grappe de raisin, ubiquitaire. *Staphylococcus aureus* tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales est aussi responsable d'intoxications alimentaires et sa résistance aux antibiotiques est parfois un grand problème pour le traitement des patients [49], [56].

1.4.2.1.2. *Staphylococcus epidermidis*

C'est une bactérie, habituellement non pathogène qui est retrouvée sur la peau et les muqueuses humaines et animales. Elle est la cause importante d'infections chez les patients dont le système immunitaire est déprimé et est responsable d'infections cutanées, nasales et urinaires. De plus, il peut se produire des biofilms permettant d'adhérer aux surfaces des prothèses médicales. Cette bactérie peut être résistante à une grande variété d'antibiotiques tels que la pénicilline et la méticilline [49].

1.4.2.1.3. *Enterococcus faecalis*

C'est une bactérie, anaérobie facultative, qui habite le tube digestif des humains et d'autres mammifères. Elle cause des infections mortelles chez l'homme, particulièrement dans les environnements hospitaliers. Elle possède un haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques tels que les aminoglycosides, l'aztréonam, les céphalosporines et la clindamycin [49].

1.4.2.1.4. *Micrococcus luteus*

Cette bactérie, caractérisée par la production des colonies jaunes brillantes sur gélose nutritive, sa capacité à montrer la dormance, sans formation de spores, supporte les conditions extrêmes, comme les basses températures et la famine. Elle pousse à une température qui se situe autour de 37 ° C de son milieu habituel, où on la trouve dans la cavité nasale et / ou peau. Elle pousse aussi dans la bière, et se trouve dans le sol. *M. luteus* est connue pour sa croissance dans les produits laitiers et peut être transmise via la consommation de lait et fait partie de la flore cutanée humaine.

Micrococcus n'est pas considéré comme un agent pathogène, mais chez les personnes ayant un système immunitaire compromis, tels que les nouveau-nés ou les patients atteints du SIDA, *M. luteus* peut causer des infections de la peau qui produisent les éruptions prurigineuses, parfois avec ulcération centrale, accompagnée de fortes démangeaisons [57], [58], [59].

1.4.2.1.5. Bacillus subtilis

Elle est capable de former des spores, qui lui permettent de survivre longtemps dans des conditions extrêmes, telles que la dessiccation, la chaleur ou les radiations. Elle est aussi capable d'affronter des situations telles que les stress osmotiques, oxydatifs, acides ou les chocs thermiques [60].

1.4.2.2. Bactéries à Grams négatifs

1.4.2.2.1. Escherichia coli

Bacille aérobique que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain, c'est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales [61].

1.4.2.2.2. Pseudomonas aeruginosa

Bacille aérobique, et très mobile grâce à un flagelle polaire. Il est de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales (germe ubiquitaire). C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement ; Il s'agit souvent de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques [49], [62].

1.4.2.2.3. Klebsiella pneumoniae

Bacille aéro-anaérobique, immobile, qui fait partie de la flore intestinale et peut être responsable d'infections urinaires et respiratoires [49].

1.4.2.3. Mycètes.

1.4.2.3.1. Candida albicans

Ce sont des mycètes non pigmentée, non encapsulée, à bourgeonnement multiple et formant un pseudo-mycélium et du mycélium vrai. C'est un

saprophyte endogène de la lumière intestinale humaine et des cavités génitales (chez la femme) [49], [63].

Elle est principalement à l'origine de la candidose disséminée. C'est un champignon fréquemment retrouvé au niveau de la bouche et du tractus gastro-intestinal de plusieurs personnes normales. Parmi les conditions favorisant une infection à candida, notons le diabète, la grossesse, les antibiotiques, les cortico- stéroïdes et toute maladie pouvant affecter l'état général d'un individu. La nystatine (Mycostatin) est très efficace dans le contrôle des infections muco-cutanées [64].

1.4.3. Principales substances antimicrobiennes

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques [65].

La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments [66], [67].

Les plantes ont de nombreuses façons de générer des composés antimicrobiens pour les protéger contre les pathogènes. Les surfaces végétales externes sont souvent protégées par des biopolymères tel que les cires, les esters d'acides gras comme la subérine et la cutine. En outre, les tissus externes peuvent être riches en composés phénoliques, alcaloïdes, terpénoïdes et d'autres composés qui inhibent le développement de champignons et de bactéries [49].

1.4.4. Mécanisme de l'effet antimicrobien

Il est sans doute très complexe, peut impliquer de multiples modes d'actions tels que l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer, l'inhibition du métabolisme microbien, la dégradation de la paroi cellulaire, la perturbation de la membrane cytoplasmique (ce qui cause une fuite des composants cellulaires), l'influence sur la synthèse de l'ADN et de l'ARN, des protéines et des lipides [49].

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

Les expérimentations ont été réalisées au niveau des laboratoires de l'université Blida1, faculté des sciences de la nature et de la vie (SNV) ; Laboratoire de recherche de biotechnologie environnement et santé.

Des tests ont été réalisés durant les deux périodes de récoltes du cycle de la plante (Végétation/Floraison). Notre travail de recherche s'est axée sur :

- ✓ Identification de la plante *Marrubium vulgare*
- ✓ Etude de la teneur l'eau, taux d'humidité, taux de cendres, screening phytochimique.
- ✓ Extractions des métabolites secondaires, analyse des l'extraits méthanoliques par CCM, HPLC et spectrophotométrie UV-Visibles pour la caractéristiques de quelques métabolites secondaires.
- ✓ Activité antioxydante.
- ✓ Activité antimicrobienne sur des souches référenciées.

2.1. Matériel

Durant nos expérimentations nous avons utilisé un matériel non biologique (Appendice B) et un matériel biologique citant le matériel végétal (feuilles de marrube blanc) et microbiologique (bactéries et champignon).

2.1.1. Matériel biologique

2.1.1.1. Matériel végétal

Le marrube blanc est une espèce répandue à l'état spontané dans pratiquement tous les étages bioclimatiques en Algérie. Il est utilisé par les herboristes comme plante à caractère thérapeutique (Figure 2.1).



Figure 2.1 : Vue générale de l'espèce *Marrubium vulgare*

La récolte du matériel végétal s'est effectuée dans la région de Djouab, wilaya de Médéa, dont l'échantillonnage s'est réalisé en deux périodes :

- Végétation (Février 2014) (Figures 2.2)
- Floraison (Mai 2014) (Figures 2.3).

La plante a été identifiée selon les clés de détermination de Quezel et Santa [19] et Bonnie [21].

Des échantillons ont été conservés à l'état frais afin de déterminer la teneur en eau de la plante. Le reste du végétal récolté a été séché à l'ombre à l'abri de la lumière, à température ambiante, ensuite broyé à l'aide d'un mixeur pour obtenir la drogue, qui va servir à l'étude phytochimique et à la préparation des différents extraits.



Figure 2.2: *M. vulgare* en période de végétation (Février 2014)



Figure 2.3: *M. vulgare* en période de floraison (Mai 2014)

2.1.1.2. Matériel microbiologique

Les souches utilisées dans notre étude ont été choisies pour leurs fréquences élevées de pathogénicité [81].

Les tests ont été réalisés sur huit bactéries (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Entérocooccus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*). Nous avons, utilisé aussi pour le test un champignon (*Candida albicans*), qui provient du laboratoire de microbiologie de l'hôpital Frantz Fanon de Blida et du laboratoire de recherche de Biotechnologie végétale, environnement et santé.

Ces souches ont été reçues dans des tubes stériles contenant de gélose de conservation. Ils ont été conservés à une température de $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.2. Méthodes

2.2.1. Présentation de la zone d'étude

La Wilaya de Médéa se situe à 36°04' 00" latitude Nord et 03°00'00" longitude Est, sur une altitude d'environ 800 m. Elle est située au Nord par les Wilaya d'Alger et Blida, à l'Ouest par Ain Djelfa à l'Est par Bouira et au Sud par Djelfa, M'Sila et Biskra (Figure2.4).

La commune de Djouab elle situé à 36°08'00" latitude Nord et 3°26'00" longitude Est, sur une altitude d'environ 863m. Avec une superficie de 105Km².

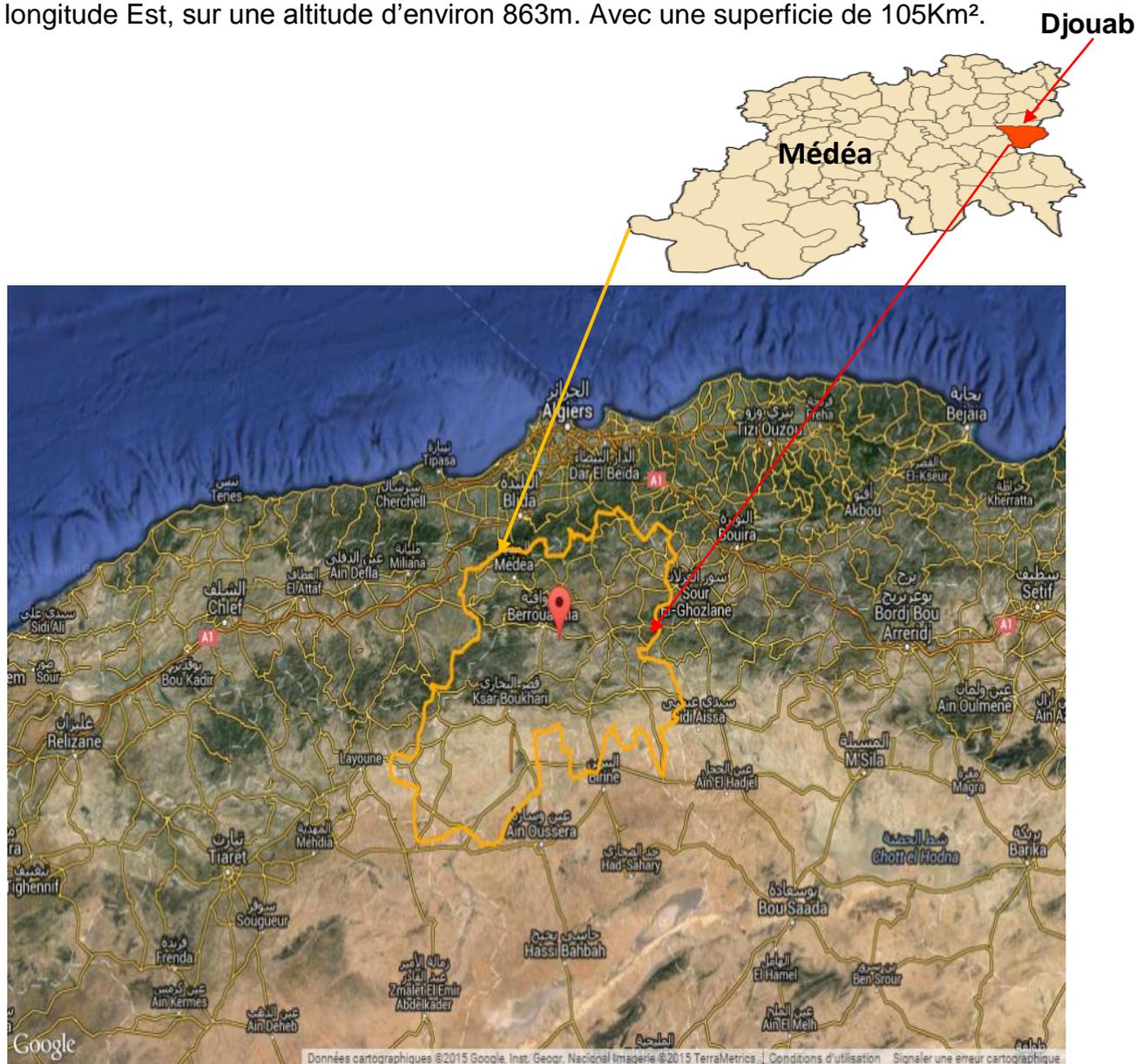


Figure 2.4 : Localisation géographique de la zone d'étude [82]

2.2.2. Reconnaissance botanique

Le but de cette étape est de chercher d'éventuelles spécificités morphologiques et anatomiques de la plante.

2.2.2.1. Etude macroscopique

Nous avons cherché des spécificités florales et foliaires caractéristiques de *Marrubium vulgare*. Nous avons observé à l'aide d'une loupe binoculaire les organes suivants :

- Poils tecteurs sur les différentes pièces de la fleur, la tige et les feuilles.
- Présence de poils sécréteurs d'huiles essentielles.
- Forme des feuilles, et leurs positions par rapport aux tiges.
- Forme des tiges
- Pièces florales
- Forme des fruits

2.2.2.2. Examen microscopique

Nous avons étudié dans cette étape la partie arienne (tige, limbe et pétiole), plusieurs coupes histologiques ont été réalisées selon le protocole de double coloration, adopté au sein du laboratoire de recherche de biotechnologie végétale, environnement et santé.

Les étapes suivies sont [151] in [152] :

- ✚ les coupes sont plongées dans l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 10 à 15 minutes pour vider les cellules de leur contenu,
- ✚ Après rinçage à l'eau courante 5 à 10 minutes, les coupes sont traitées par l'acide acétique (10%) pendant 1 à 2 minutes,
- ✚ Elles sont ensuite lavées à l'eau courante 5 à 10 minutes et placées dans le vert de méthyle pendant 15 à 20 minutes,
- ✚ Les coupes sont rincées à l'eau courante pendant 5 à 10 minutes puis nous les plongeons dans le rouge Congo 15-20 minutes,
- ✚ Les coupes sont ensuite lavées à l'eau, montées entre lame et lamelle et observées au microscope photonique (grossissement X10, 40).

2.2.3. Etude phytochimique

2.2.3.1. Détermination de la teneur en eau

Nous avons suivi le protocole de ZERRAD et *al.*, (2006) [83]. Ainsi, nous avons placé des échantillons de feuilles de poids déterminé dans une étuve portée à $75\pm 2^\circ\text{C}$. Les échantillons ont été pesés chaque 24 heures, pendant une semaine, jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Appendice C, tableaux 1 et 2)

Selon la formule nous avons déterminé la teneur en eau:

$$\text{Teneur en eau} = \frac{\text{Poids frais} - \text{Poids sec}}{\text{Poids frais}} \times 100$$

2.2.3.2. Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité dans la poudre végétale est l'un des indices importants qui caractérisent la bonne qualité de celle-ci. Les plantes médicinales ne doivent pas contenir une quantité d'humidité dépassant la norme décrite par la pharmacopée européenne [147].

Nous avons mis 1 g de poudre végétale dans un creuset en porcelaine préalablement séché et pesé. L'échantillon est placé dans une étuve à $105\pm 5^\circ\text{C}$ durant 2 heures. Après avoir obtenu un poids constant le pourcentage d'eau contenue dans la poudre est calculé selon la formule suivante [149] *in* [84] :

$$\text{H}\% = (M - M_1) / M \times 100$$

H%: Taux d'humidité de la poudre

M : Masse de l'échantillon prise en gramme

M1 : Masse de l'échantillon après séchage en gramme

2.2.3.3. Détermination de taux de cendres

La minéralisation a été réalisée selon la méthode de MARTIN et *al.*, (1984) [85] qui consiste à incinérer et à calciner la poudre végétale jusqu' à l'obtention des cendres blanches.

Les creusets vides sont déposés au four puis refroidis et tarés. Dans chacun est introduite une prise d'essai de 2g. Ensuite, ces creusets sont mis au four à moufle à (500-550±7 °C) pendant 4 à 6 heures. Ils sont ensuite déposés dans un dessiccateur pour refroidir avant leur pesée.

Le taux de cendres est calculé par la formule suivante (Appendice C, tableau 3.4) :

$$TC = \frac{\text{Masse des cendres}}{\text{Masse de poudre de la plante essai}} \times 100$$

TC : Taux de cendres

Masse des cendres = masse totale après calcination – tare

Masse de poudre de la plante essai = masse totale avant calcination – tare.

2.2.3.4. Caractérisation de quelques métabolites secondaires

- Screening phytochimique :

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques d'identification de la présence des substances chimiques. Les principaux groupes phytochimiques sont, les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins et coumarines), les saponosides, les stérols et les terpènes.

Le screening phytochimique est effectué sur la poudre, l'infusé et le décocté de la partie aérienne de la plante (feuilles).

- ✓ Préparation de l'infusé à 5% :

Introduire 5g de poudre dans 100ml d'eau bouillante contenue dans un erlenmeyer de 250ml, fermer et laisser infuser pendant 15 minutes, ensuite filtrer sur papier filtre et rincer avec un peu d'eau chaude de manière à obtenir 100ml de filtrat [86].

2.2.3.4.1. Caractérisation des anthocyanes

Rajouter quelques gouttes d'HCl à 5 ml d'infusé. La réaction donne une coloration rouge en présence d'Anthocyanes [3].

2.2.3.4.2. Caractérisation des tanins

Prendre 5 ml de l'infusé, auquel vous ajouter 1 ml d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3) à 1%. L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des tanins catéchiques, et le bleu noirâtre, la présence des tanins galliques.

La différenciation des tanins catéchiques et galliques est obtenue par la réaction de Stiasny. A 30ml d'infusé à 5%, ajouter 15ml de réactif de Stiasny (10ml de formol à 40% + 5ml d'acide chlorhydrique concentré), puis chauffer au bain Marie pendant 15 à 30 minutes. L'obtention de précipité montre la présence de tanins catéchiques. Filtrer et saturer 10ml de filtrat avec l'acétate de sodium pulvérisé. Ajouter 1ml d'une solution de FeCl_3 à 1%. Le développement d'une teinte noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny [86].

2.2.3.4.3. Caractérisation des flavonoïdes

- ✓ Réaction à cyanidine

Introduire dans un tube à essai 5ml d'infusé, ajouter 5ml d'éthanol chlorhydrique (éthanol à 95°, eau distillée, acide chlorhydrique concentré à parties égales V/ V/ V = 5ml), puis quelques copeaux de magnésium et 1ml d'alcool isoamylique, il y'a eu l'apparition d'une coloration rose-orangée en

présence de flavones ou rose-violacée (flavonones) ou rouge (flavonol, flavononol) [86].

2.2.3.4.4. Caractérisation des saponines

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse (IM). Ce dernier est le degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Une décoction est préparée à 1% de la poudre végétale (1g de poudre où nous avons ajouté 100ml d'eau distillée puis mise en ébullition pendant 15minutes, la suspension est ensuite filtrée). À partir de cette solution mère, 10 tubes ont été préparés avec 1, 2, 3, 4, 5,6, 7, 8, 9 et 10 ml. Le volume final de chaque tube a été réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun des tubes a été agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 minutes en position verticale. Le tube dont la hauteur est de 1cm indique la valeur de l'indice de mousse, ce dernier est alors calculé par la formule suivante.

$$IM = 1000 / n^{\circ} \text{ du tube à 1cm de mousse à hauteur}$$

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (Appendice B, figure 2) [86].

✓ Test de confirmation

À 2 ml d'infusé rajouter quelques gouttes d'acétate de plomb. La formation d'un précipité blanc indique la présence des saponines [86].

2.2.3.4.5. Caractérisation des alcaloïdes

A la poudre végétale séchée (10 g), ajouter l'acide sulfurique à 10% (50 ml) dans un erlenmeyer de 250 ml. Laisser en macération pendant 24 heures à la température du laboratoire. Filtrer, puis compléter le filtrat ainsi obtenu à 50 ml, avec de l'eau distillée.

Dans deux tubes à essai, introduire le filtrat (1 ml) et ajouter le réactif de Mayer qui est une solution aqueuse de mercuri-iodure de potassium (5 gouttes)

dans le premier tube et dans le second tube le réactif de Dragendorff qui est une solution aqueuse d'iode de bismuth et iodure de potassium (5 gouttes).

L'apparition d'un précipité indique la présence des alcaloïdes [78].

2.2.3.4.6. Caractérisation des terpènes et stérols

Procéder à la macération 5g de poudre végétale dans 20 ml d'éther pendant 24 heures. Evaporer jusqu'à l'obtention d'un produit sec, puis dissoudre le résidu dans 1 ml d'anhydride acétique puis 1 ml de chloroforme. Partager dans deux tubes à essai, l'un servant de témoin. Mettre dans le second tube 1 à 2 ml d' H_2SO_4 concentré. A la zone de contact des deux liquides il y a formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, la couche surnageant devenant verte ou violette révèle la présence de stérol et terpènes [88], [86].

2.2.3.4.7. Caractérisation des coumarines

Nous avons bouilli 2 g de poudre végétale dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 min dans un bain Marie, après refroidissement et filtration . Nous avons pris 5 ml du filtrat auquel nous avons ajouté 10 gouttes de KOH 10 % et quelques gouttes d'HCl 10 %, l'apparition d'un trouble indique la présence des coumarines [89].

2.2.3.5. Méthode d'extraction par Soxhlet

L'extracteur de Soxhlet est un appareil spécifique conçu pour l'extraction continue solide liquide. Le solvant est porté à ébullition. Ensuite, il est condensé avec le condenseur, contenant le solide à extraire dans une cartouche (filtre) de papier épais. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure pendant l'accumulation du solvant dans le réservoir, quand il atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute. Ce cycle peut être répété plusieurs fois (Figure 2.5) [90].

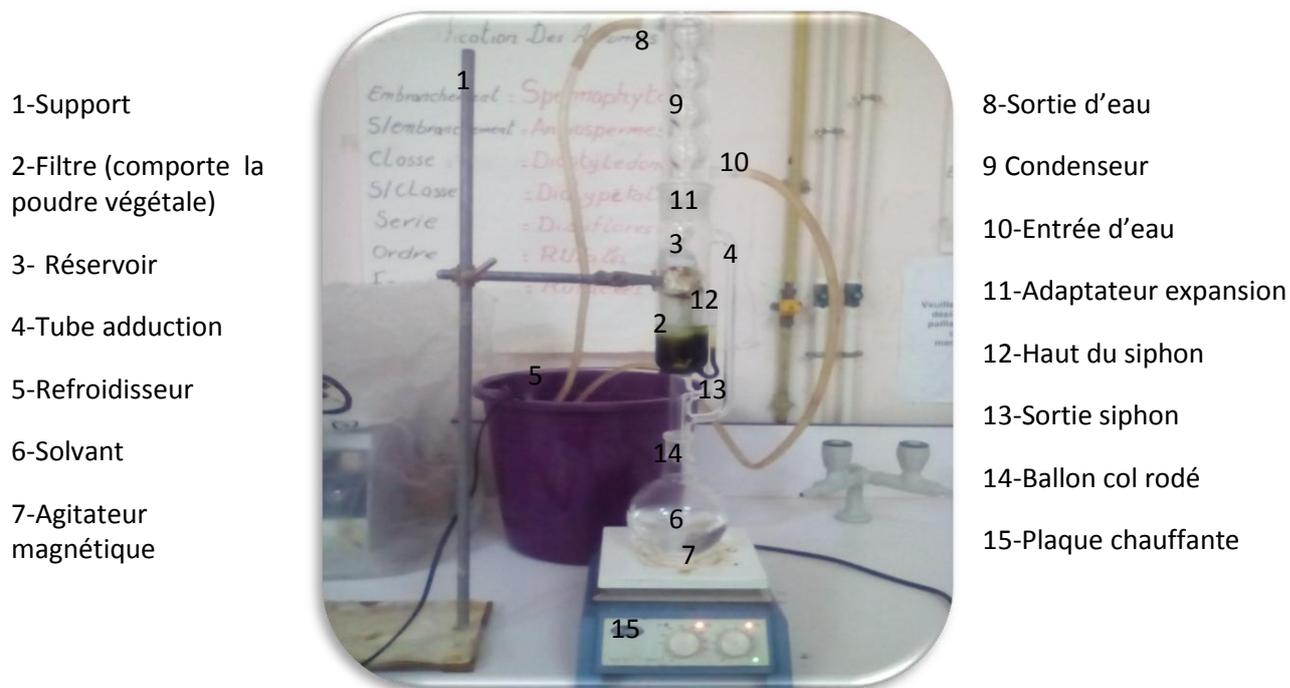


Figure 2.5: Description d'un extracteur de Soxhlet

2.2.3.5.1. Préparation des extraits

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

Les ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer le rendement de chacun des extraits (Figure 2.6) [91], [92].



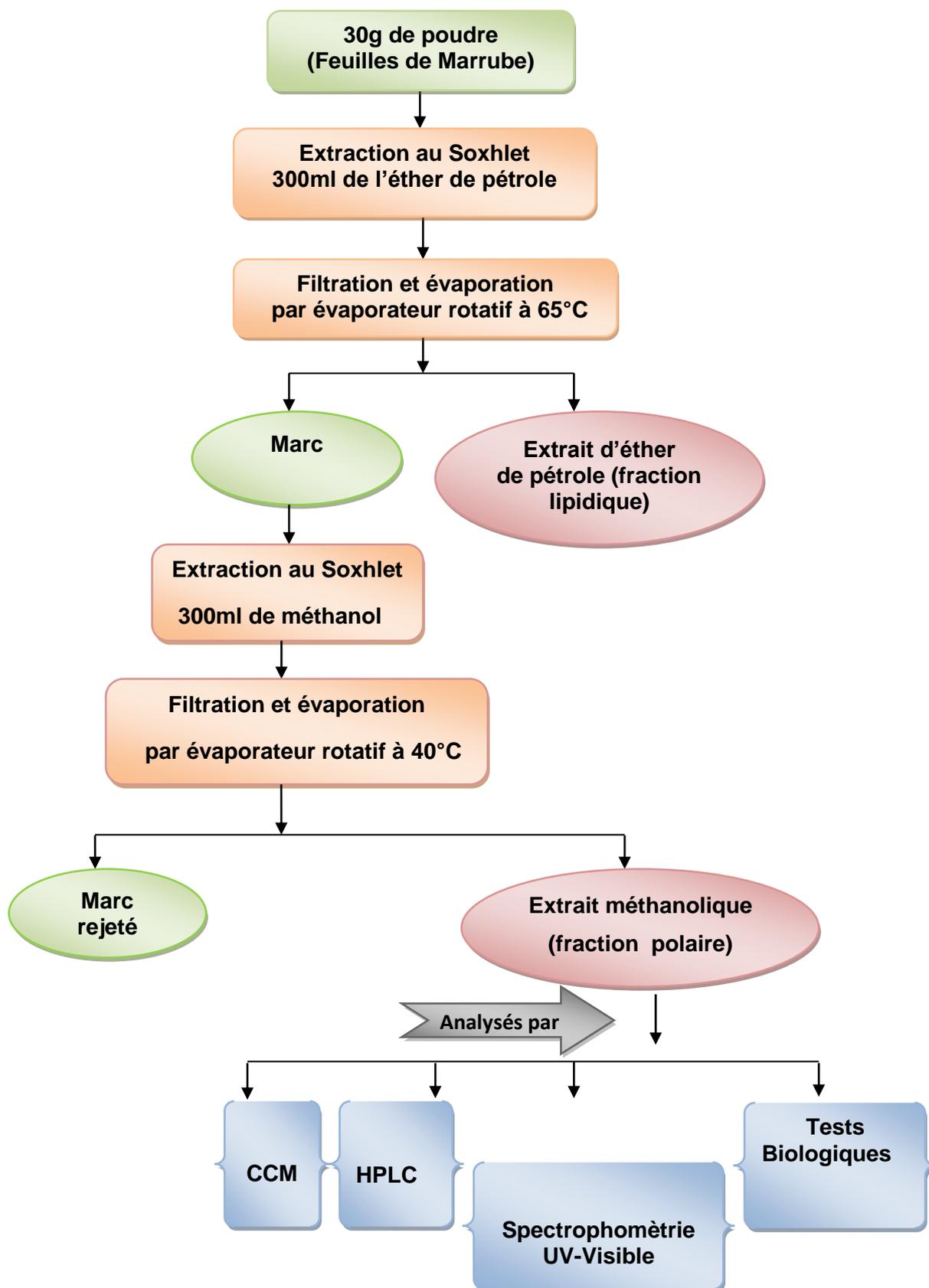


Figure 2.6 : Protocole expérimental d'extraction des composés phénoliques par Soxhlet [91], [92].

2.2.3.5.2. Détermination du rendement

Le rendement est la quantité des composés ou substances pouvant être extraites par un solvant typique dans des conditions spécifiques [89].

Le calcul du rendement :

$$\text{Rendement (R\%)} = \frac{\text{Masse du résidu}}{\text{Masse de la poudre végétale}} * 100$$

R% : rendement par rapport au poids de la matière végétale utilisée.

2.2.3.5.3. Analyse des l'extrait méthanolique par CCM

Le but de cette analyse est la caractérisation, vérification rapide de la présence des métabolites secondaires dans l'extrait méthanolique en deux périodes de récoltes de *Marrubium vulgare*.

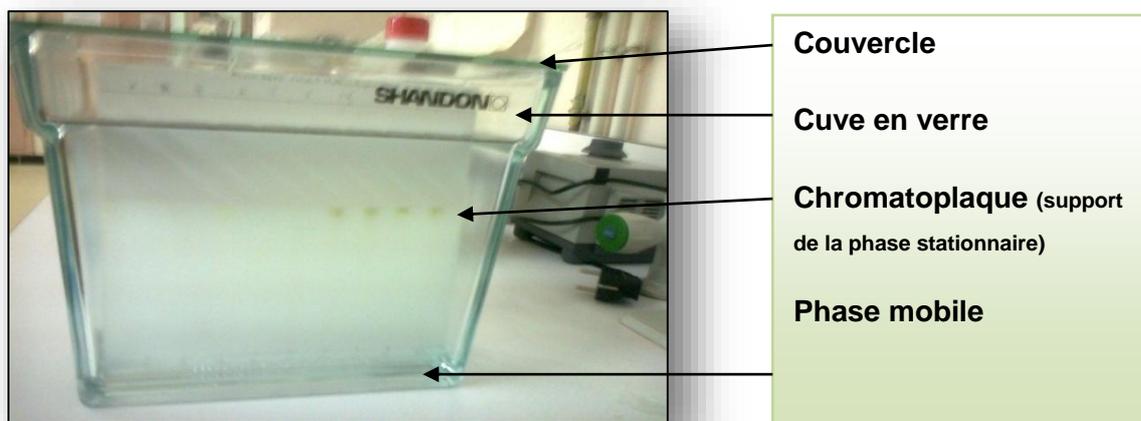


Figure 2.7. Chromatographie sur couche mince (original)

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (Rf). Chaque tache correspond à un constituant qui est identifié par comparaison du Rf avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques; même Rf) (Figure 2.7). Le rapport frontal (Rf) est déterminé pour chaque constituant comme suit [110], [94] :

$$R_f = d/D$$

d: Distance parcourue par la substance (centre de la tache)

D : Distance parcourue par le solvant

- Protocole

Les extraits méthanoliques ont été analysés par la CCM, réalisées sur des plaques de gel de silice 60 F254 de taille 20X20cm (phase stationnaire). En utilisant : n-butanol/acide acétique /eau (60 :15 :25 ; v/v/v) (phase mobile), Des spots de 10 µL d'extrait et de témoins (acide gallique, rutine, acide tannique, quercétine) à une concentration de 1 mg/ml dans le méthanol, ont été déposés à 1 cm du bord inférieur de la plaque, et la migration a été comparée, sous lumière ultraviolette à 318nm, le rapport frontal (Rf) des taches résultant de la séparation a été calculé et comparé à ceux des témoins, permettant ainsi l'identification des divers composés des extraits méthanoliques [26].

2.2.3.5.4. Analyses des extraits méthanoliques par HPLC

L'analyse qualitative par HPLC a pour but de déterminer la composition des extraits méthanoliques.

L'analyse a été réalisée en utilisant la chromatographie à haute performance à barrette d'iodes (HPLC/DAD).

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation. Elle fait intervenir deux variables dans la séparation d'un mélange ; la phase stationnaire (la colonne) et la phase mobile (le ou les solvants). Les interactions entre le mélange, les particules de la colonne et les solvants employés vont permettre une séparation qui pourra être optimisée en faisant varier surtout la composition de notre phase mobile. Cette dernière est poussée avec pression (pompe) sur la colonne, entraînant le mélange à séparer, et c'est cette pression qui permet de faire passer le solvant à travers

de très petites particules à une vitesse raisonnable, ce qui permet d'obtenir une haute résolution [94].

Les analyses en HPLC (Agilent technologie 1260 infinity) sont effectuées à l'aide d'un appareillage constitué :

- Pompe (Agilent G1311B)
- Colonne (Agilent 1315D)
- Détecteur UV-Visible (Agilent, barrette d'iode)
- Thermostat (Agilent G1330B)
- Injecteur automatique (Agilent G1329B)

Tableau 2.1: Conditions opératoires de HPLC-DAD

Matériel	Type et caractéristiques
Colonne	- C18 - Ø : 4,6X250mm - 22±0,8C°
Pompe	Débit : 1 ml / mn
Détecteur UV	270<λ<370
Injecteur automatique	Volume d'injection = 5µl

Phase mobile utilisée pour la séparation des constituants des extraits méthanoliques en deux périodes de *Marrubium vulgare* et pour les témoins (étalons) :

- Solvant A : CH₃ COOH à 0,2% (acide acétique) et l'eau
- Solvant B: C₂ H₃ N (Acétonitril)

Le détecteur UV à barrette diode (DAD) est déterminé par un balayage entre λ égale 190 nm et 800 nm, un intervalle a été choisi 270<λ<370 pour les composées phénoliques.

Tous les solvants utilisés sont spécifiques à l'HPLC, et tous les échantillons injectés ont été filtrés préalablement avant analyse.

Après chaque injection le système analytique est rincé avec un solvant de méthanol pour s'assurer de déloger les produits qui auraient pu demeurer sur la colonne.

Toutes les composantes ont été identifiées par comparaison avec les temps de rétentions des témoins (étalons).

2.2.3.6. Dosages des métabolites secondaires

Cette analyse est effectuée par spectrophotométrie UV-Visible, c'est une méthode physico-chimique dépendant de la structure de la molécule. L'absorption d'énergie est quantifiée et résulte du passage des électrons orbitaux de l'état fondamental vers des orbitales d'un état excité d'énergie supérieur. La structure particulière des molécules est liée à une absorption plus ou moins importante à chaque longueur d'onde observable (UV de 200 à 400 nm ; Visible de 400 à 800 nm) ce qui peut se traduire par l'établissement d'un spectre d'absorption. L'absorption dans le domaine du visible est courante et se traduit par une coloration de l'échantillon [95], [96].

Les différents dosages sont réalisés à l'aide d'un appareil de type, SHIMADZU (UV-1601).

2.2.3.6.1. Dosage des polyphénols totaux

Le Folin-Ciocalteu est un réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés, après déterminé par spectrophotométrie [102].

Le mode opératoire consiste à prendre un volume de 200 μ l de l'extrait, un volume de 1 ml du réactif Folin-Ciocalteu (dilué dix fois) était ajouté. Après 4 mn, un volume de 800 μ l de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (7,5% dans l'eau distillée) a été versé sur la solution. Les tubes ont été placés à l'obscurité.

Après deux heures, les résultats sont lus sur spectrophotomètre à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de la régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard (étalon) l'acide gallique (5 à 200µg/ml) est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS).

2.2.3.6.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl₃) qui est utilisé pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits. Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium dont l'absorbance maximale est à λ égale 430 nm.

Une quantité de 1ml de chaque extrait est ajouté à 1ml d'une solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10mn de réaction, l'absorbance est lue à 430nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0 à 40µg/ml).

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g MS) [48].

2.2.3.6.3. Dosage des tanins condensés

Selon Broadhurst *in* [100] les tanins condensés ont été déterminés par la méthode de vanilline.

La mise en œuvre pratique, consiste à mettre un volume de 500µl de l'extrait brut auquel nous avons ajouté 3ml de la solution vanilline/méthanol(4%) et un volume de 1,5ml d'acide chlorhydrique. Le mélange est laissé au repos pendant 15mn à 20°C. L'absorbance est mesurée à 500nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchines par gramme de la matière végétale sèche (mgEC/g).

2.2.4. Activités biologiques

2.2.4.1. Activité antioxydante

2.2.4.1.1. Test au DPPH

Le principe de ce test, en présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Figure2.8) [101].

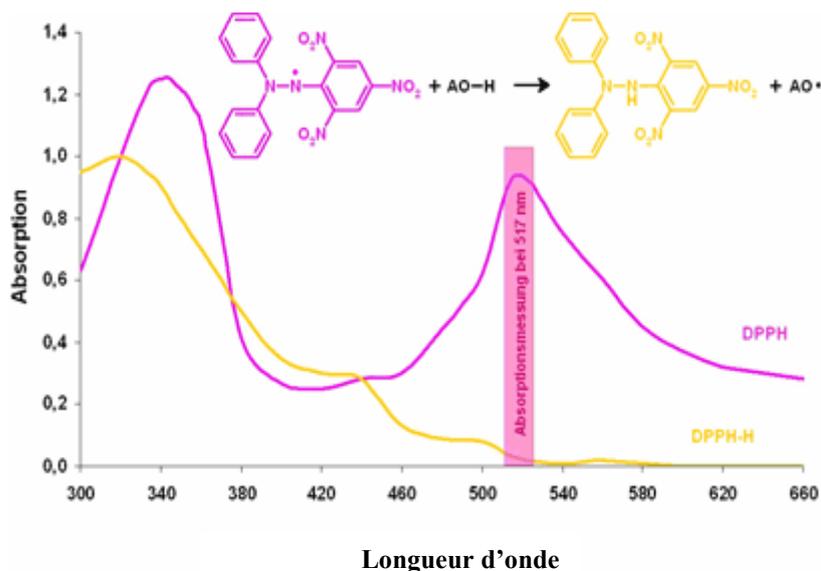


Figure2.8: Transformation du DPPH de la forme active à la forme inactive [101]

Dans des tubes à essais, nous avons introduit 1 ml de chaque extrait méthanolique (1mg/ml) et 2ml de la solution méthanolique au DPPH, après agitation au vortex, les tubes ont été placés à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes.

Le contrôle négatif est composé de 2 ml de la solution méthanolique au DPPH et de 1 ml de méthanol.

Plusieurs concentrations ont été testées (0,2 à 1mg/ml) jusqu'à l'obtention de la concentration idéale de l'extrait. Les essais ont été effectués en triple (Appendice C, tableau 5)

Des solutions standards (contrôle positif), rutine, quercétine et α tocophérol sont préparés en suivant les mêmes étapes et les mêmes conditions expérimentales (Appendice C, tableaux 6 et 7).

La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm (Spectrophotomètre SHIMADZU (UV-160))

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité antiradicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages en utilisant la formule suivante :

$$\text{Inhibition\%} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs test})}{\text{Abs control}} \times 100\%$$

Inhibition % : pourcentage de l'activité antiradicalaire

Abs control: absorbance du contrôle négatif

Abs test: absorbance de l'échantillon (extrait ou contrôle positif)

La valeur IC_{50} appelée également EC 50 (Efficient concentration 50), est déterminée pour chaque extrait méthanolique et contrôle positif. Elle est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

Les valeurs IC_{50} moyennes ont été calculées par régression linéaire $Y = aX + b$ ou $Y = 50\%$ (Appendice C, figures 1,2, 3 et 4) [102], [103], [104], [48].

2.2.4.2. Activité antimicrobienne

2.2.4.2.1. Activité antibactérienne et antifongique

L'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé standardisée par (NCLLS) cité par Celiktas *et al.*, (2007)[106].

- Microorganismes utilisés

Huit souches bactériennes et un seul champignon issues des lots de l'ATCC ont été utilisées et (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Souches bactériennes et fongique utilisées.

Souches	Gram	Références
<i>Escherichia coli</i>	-	25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	25853
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	-	4352
<i>Entérocooccus faecalis</i>	+	2035
<i>Bacillus subtilis</i>	+	9372
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	6538
<i>Saphylococcus epidermidis</i>	+	12228
<i>Micricoccus lutieus</i>	+	533
<i>Candida albicans</i>	Champignon	10231

2.2.9.1.1. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque)

➤ Milieus de cultures

Les milieux suivants ont été utilisés pour l'étude de l'effet antimicrobien :

- Gélose nutritif et gélose Mueller Hinton pour les bactéries,
- Gélose de Sabouraud à chloramphénicol pour le champignon testé

➤ Repiquage

A l'aide d'une anse de platine prélever quelques colonies à partir d'un milieu de conservation, ensemercer sur un milieu de gélose nutritif, incubé dans une étuve à 37°C pendant 24h pour avoir de jeunes colonies.

➤ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 24 heures sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%,

bien homogénéiser la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex, son opacité doit être équivalente d'une DO de 0,08 à 0,10 lue à 570nm.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant soit de la culture s'il est peu concentré, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop opaque. L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

➤ Ensemencement

Tremper un écouvillon stérile dans la suspension microbienne, l'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube puis le frotter sur la totalité de la surface gélosée de Mueller Hinton, de haut en bas, en stries serrées. Cette dernière opération a été répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois.

Les extraits méthanoliques de la plantes ont été dissous dans du DMSO à raison de 0,3g/ml. Des disques stériles de 9 mm de diamètre imprégnés de 20µl d'EMOH, ils ont été alors déposés soigneusement sur la surface de la gélose et les boîtes de pétri ont été ensuite incubées.

➤ Incubation et lecture des résultats

L'incubation a été faite à 37°C pendant 24h pour les bactéries mais pour le champignon la température retenue est de 25°C pendant 48h à 72h.

La lecture des résultats se fait par la mesure précise du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque à l'aide d'un pied à coulisse électronique (BERENT BT4171) ce qui permet de classer l'activité antimicrobienne des extraits dans l'une des catégories suivantes (Tableau .2.3):

Tableau2.3: Degré de sensibilité des souches microbiennes selon le diamètre de la zone d'inhibition [107]

Degré de sensibilité des souches	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
Souche résistante	$D=9$
Souche sensible	$10 \leq D \leq 14$
Très sensible	$15 \leq D \leq 19$
Extrêmement sensible	$D > 20$

Trois répétitions ont été réalisées, les résultats sont exprimés en (moyenne \pm Ecart type).

Les résultats sont analysés par le test ANOVA univarié et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Description botanique de la plante

Après identification de la plante *Marrubium vulgare* récoltée dans la région de Djouab, wilaya de Médéa, nous avons effectué quelques observations macroscopiques et microscopiques.

3.1.1. Etude macroscopique

3.1.1.1. Tige

Elle est quadrangulaire est tapissée de poils épidermiques (Figure 3.1).

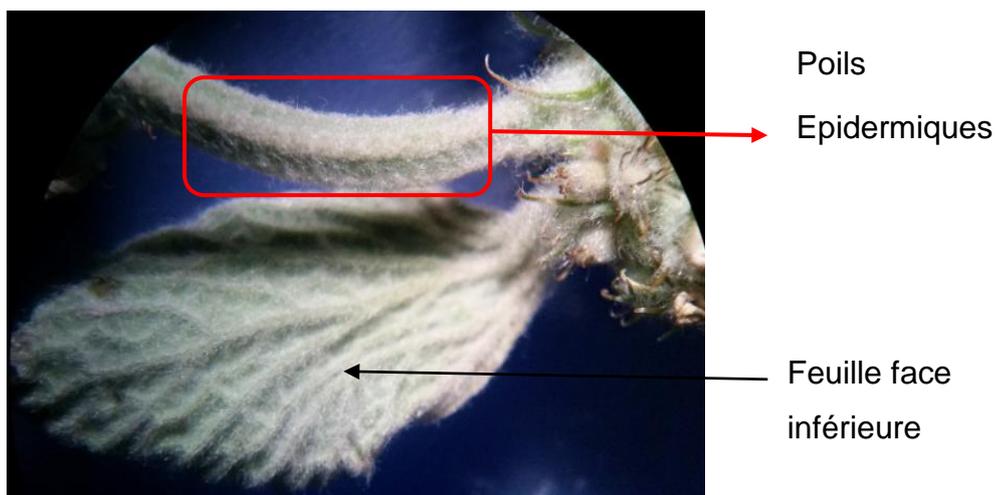


Figure 3.1: Vue d'une partie de la tige

(Loupe binoculaire G x 25)

3.1.1.2. Feuille

L'observation d'une feuille à la loupe binoculaire révèle que le pétiole est entouré d'une touffe de poils épidermiques (Figure 3.2 (A, B)). Le limbe est denté, ridé, tapissé de poils épidermiques qui recouvrent les deux faces, Figure 3.3(C, D)). La feuille est à nervation pennée, opposée et décussée (Figure 3.4, figure3.5 et figure 3.6).

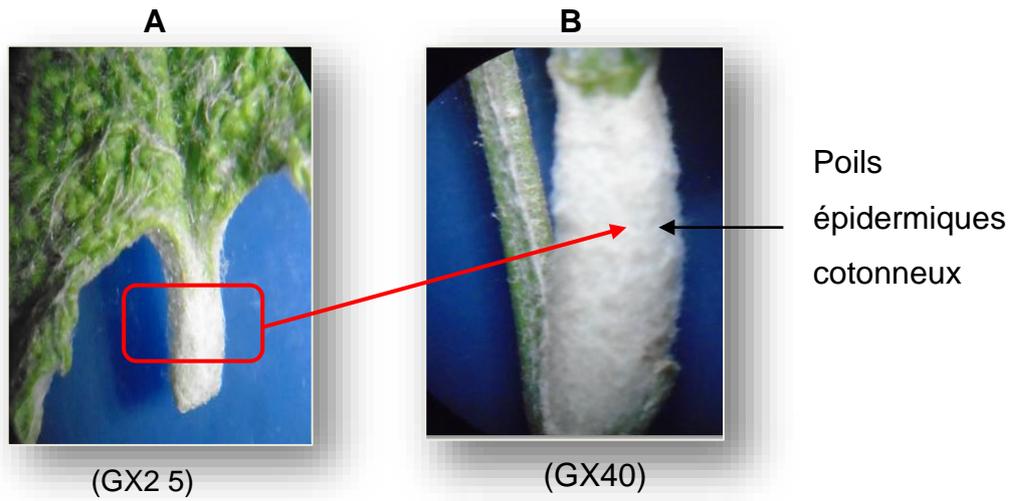


Figure 3.2 : Pétiole entouré de poils épidermiques
(Loupe binoculaire)

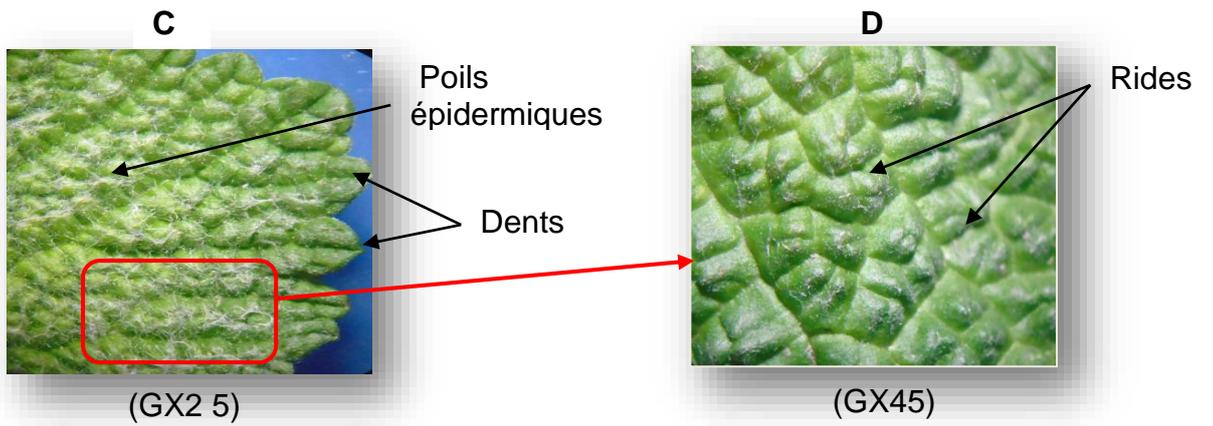


Figure 3.3 : Description d'une partie d'un limbe
(Loupe binoculaire)

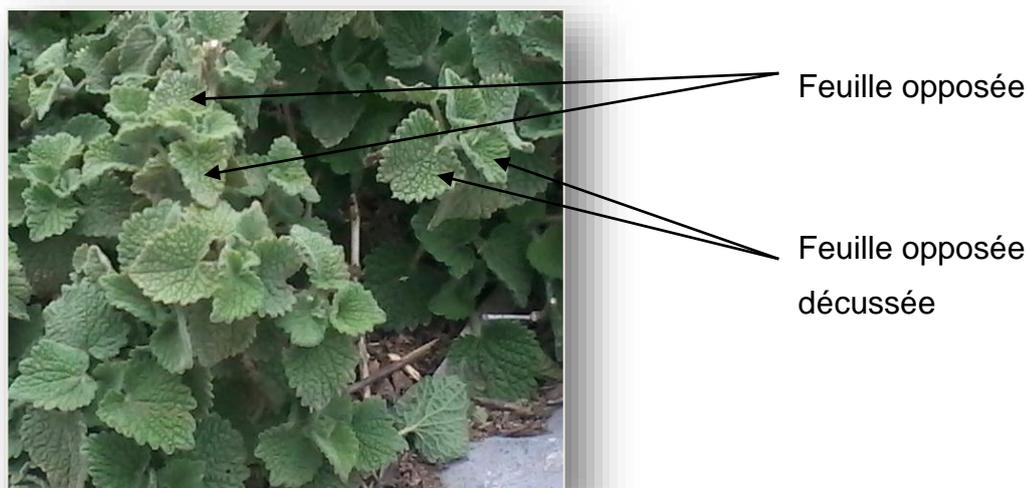


Figure 3.4: Morphologie foliaire en période de végétation



Figure 3.5 : Morphologie foliaire en période de floraison

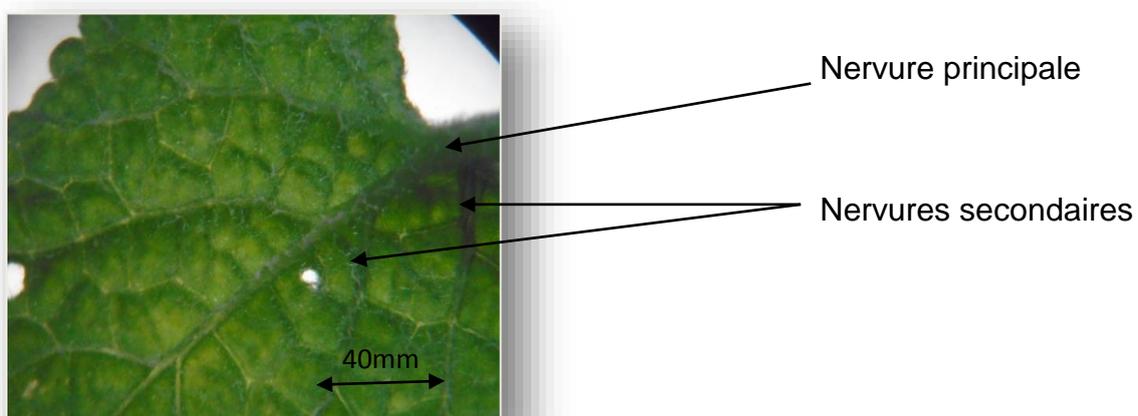


Figure 3.6 : Feuille à nervation pennée
(Loupe binoculaire GX25)

3.1.1.3.Fleurs

Les fleurs sont petites (environ 1mm). Elles sont de couleur blanche après l'épanouissement, les inflorescences sont en glomérules verticillées (Figures 3.7, 3.8 (A)). Les bractées sont linéaires aigues. Corolle blanche, tubuleuse bilabée ; avec deux lobes formant une lèvre supérieure et trois lobes formant la lèvre inférieure (Figure 3.8(B), et figure 3.9 (A, B)), renferme à l'intérieur un stigmate bifide (Figure 3.10).

Les étamines sont au nombre de 4, soudées au tube de la corolle (Figure 3.9 (D, E)). L'ovaire comprend 2 loges renfermant chacune 2 ovules (figure 3.10).

Elle présente un calice à dix dents (Figure 3.10 (A)). Après maturation, ce calice renferme 4 graines à l'intérieur de couleur brune, la graine est entourée une écorce dure et luisante (Figures 3.12).

A la loupe binoculaire, la fleur présente des poils épidermiques au niveau du calice et de la corolle (Figures 3.8(C), 3.9 et 3.11(B)).

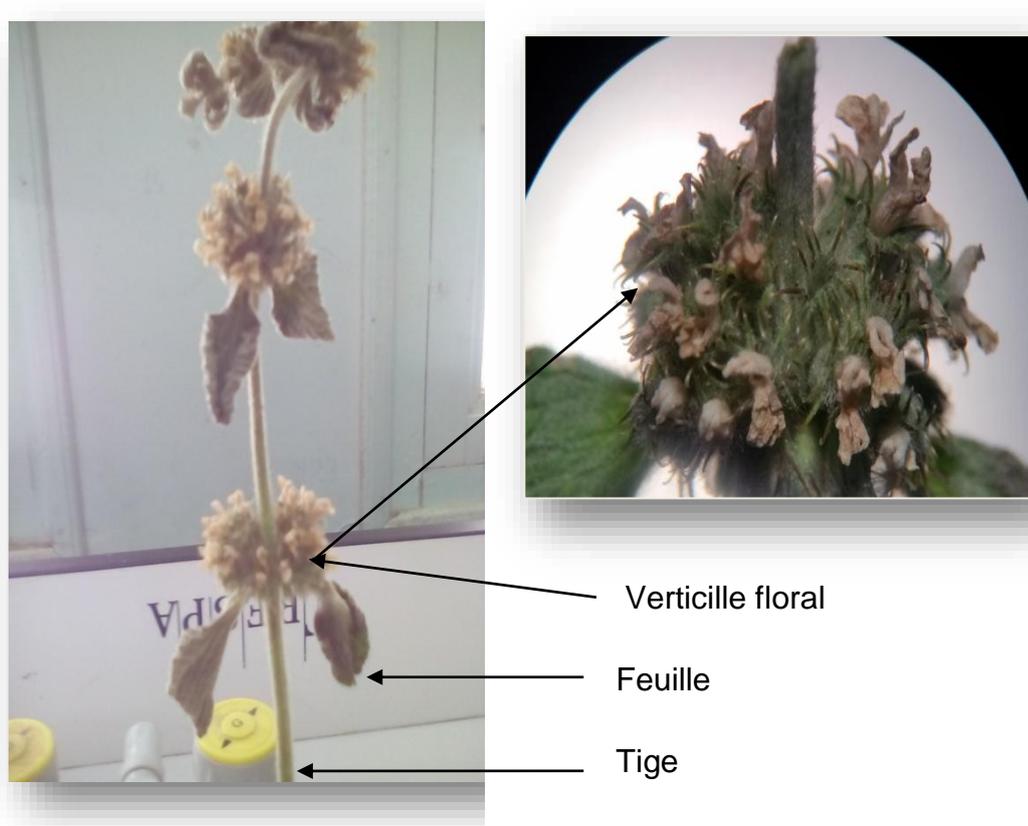


Figure 3.7 : Disposition de la fleur par rapport à la tige
(Loupe binoculaire (GX10, 5))

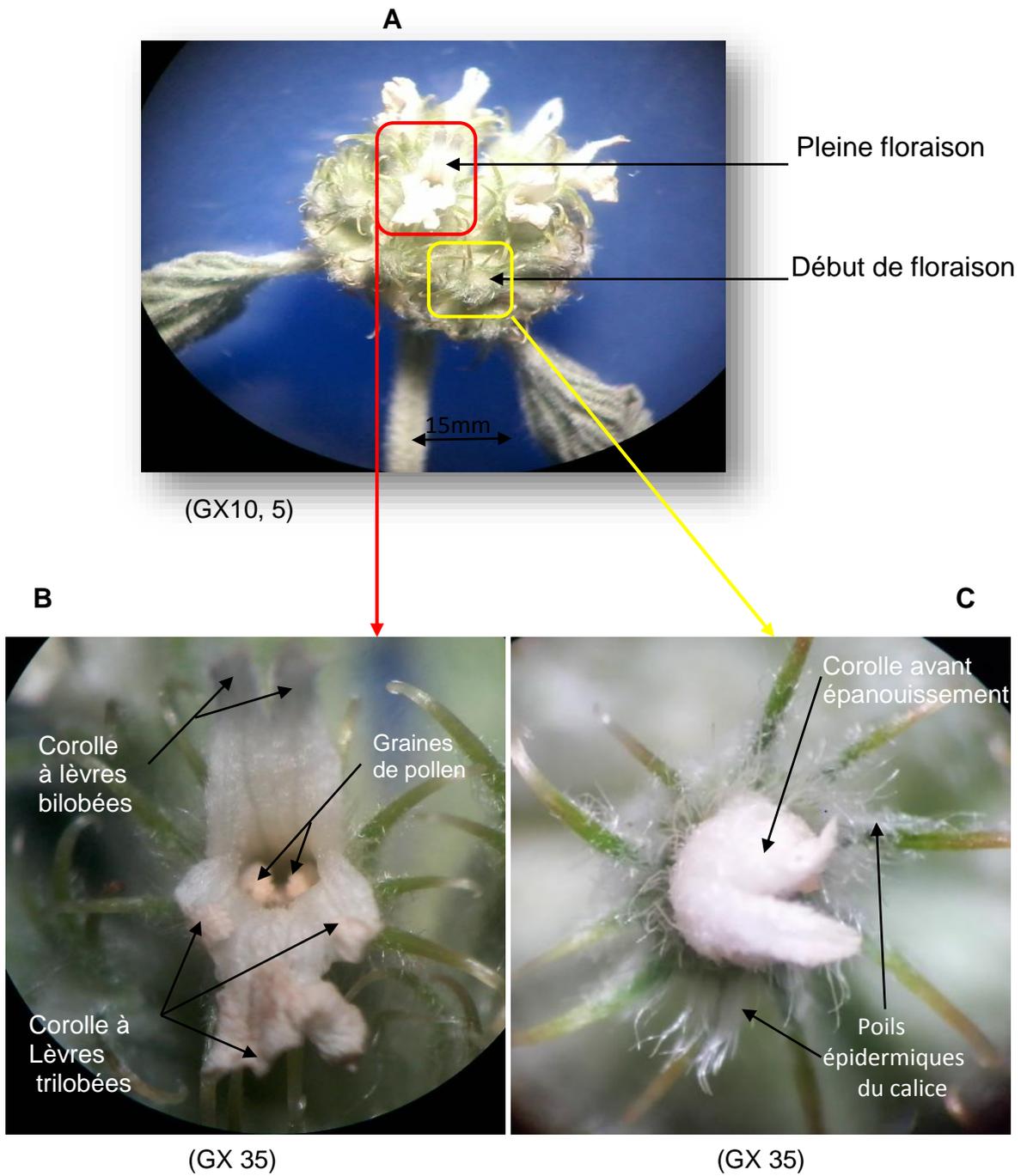


Figure 3.8 : Description de la fleur
(Loupe binoculaire)

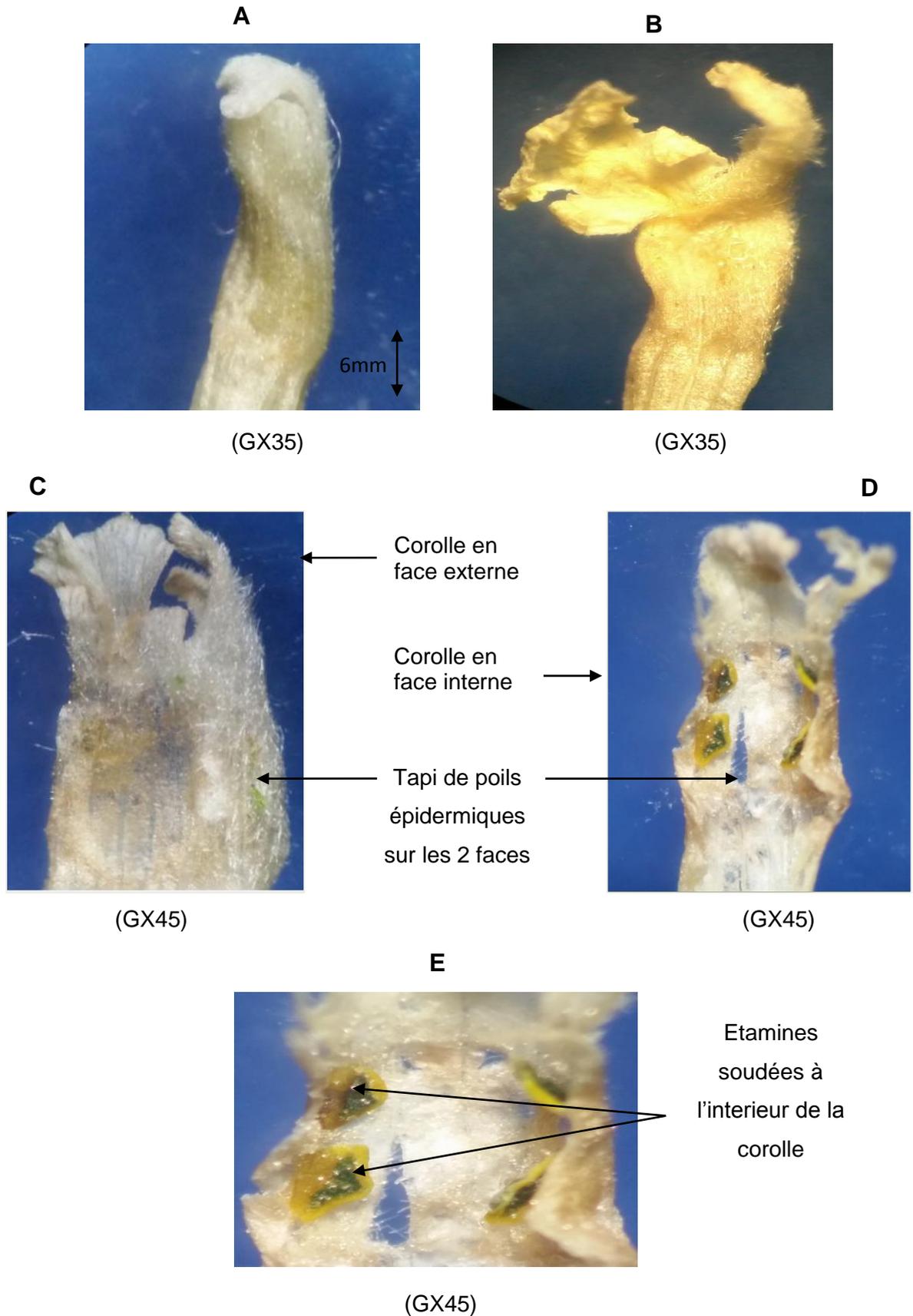


Figure 3.9 : Corolle tubuleuse (A : bouton floral fermé, B : fleur épanouie); Corolle en deux faces(C,D) ; etamines (E)

(Loupe binoculaire)

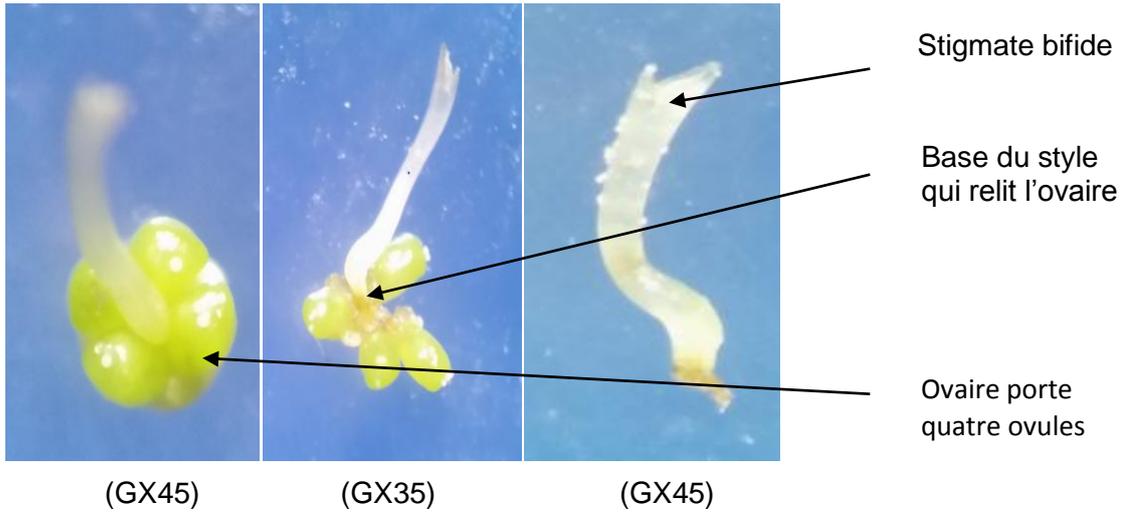
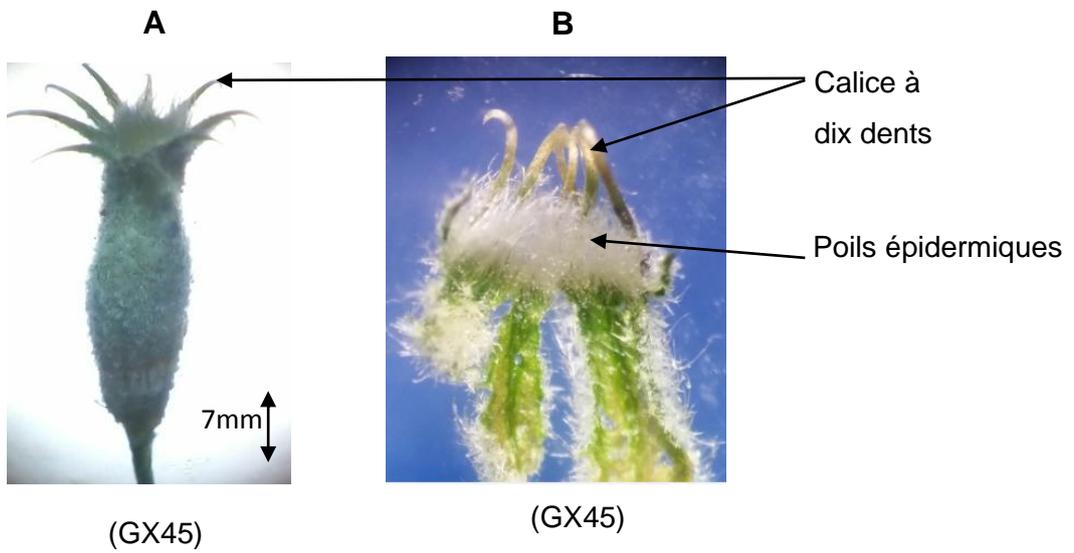


Figure 3.10 :Description de l'ovaire (Loupe binoculaire)



Figuer 3.11 : (A,B) :Clice à dix dents recouvrant de poils épidermiques sur les faces (Loupe binoculaire)

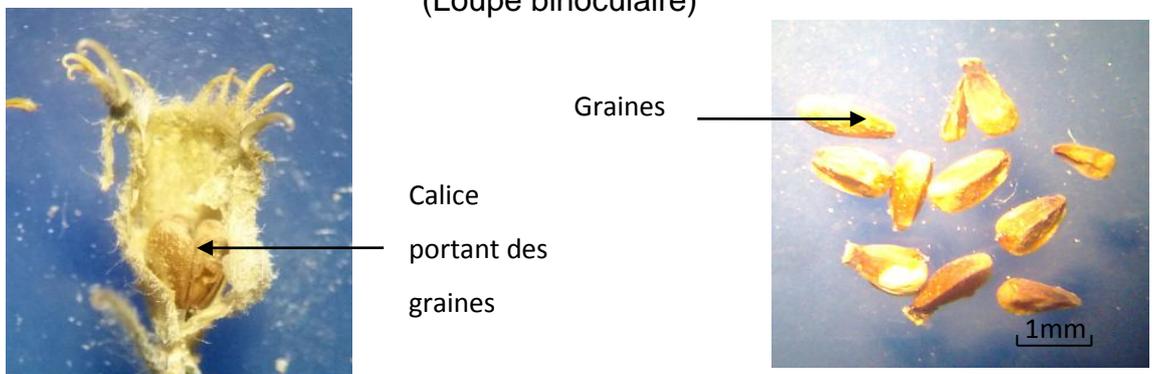


Figure 3.12 : Disposition de la graines (Loupe binoculaire GX15)

3.1.2. Examen microscopique

3.1.2.1. Feuille

3.1.2.1.1. Limbe

Vue la morphologie du limbe crénelé, nous avons eu des difficultés pour réaliser des coupes fines, néanmoins l'observation montre la présence au niveau de l'épiderme de la face supérieure et inférieure de la feuille de Marrube blanc de poils sécréteurs glanduleux, poils tecteurs et parenchyme chlorophyllien à méat (Figures 3.13, 3.14 et 3.15)

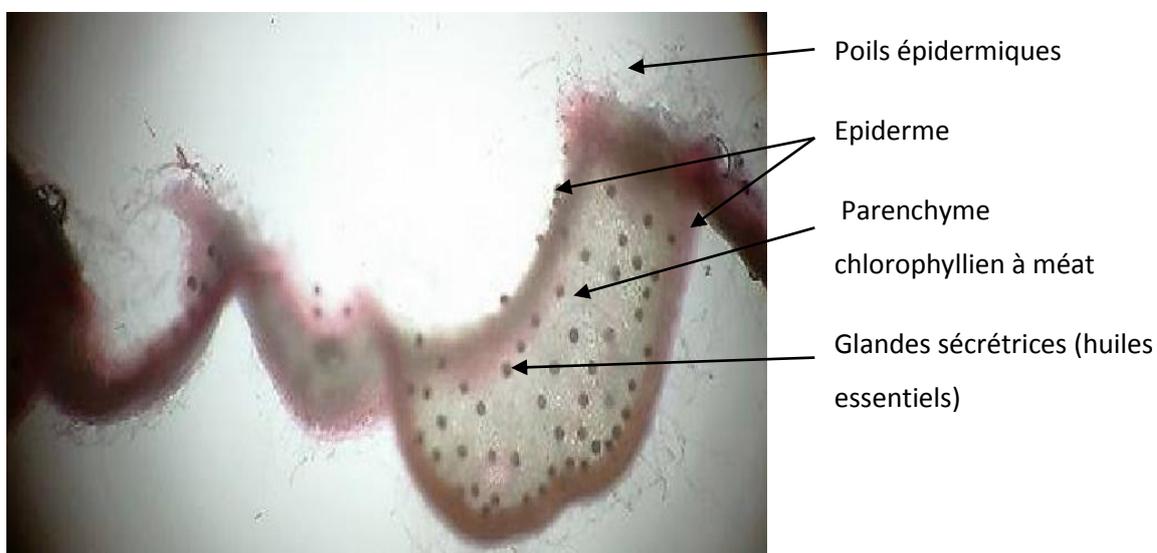


Figure 3.13 : Coupe transversale d'un limbe
(Microscope photonique GX40)

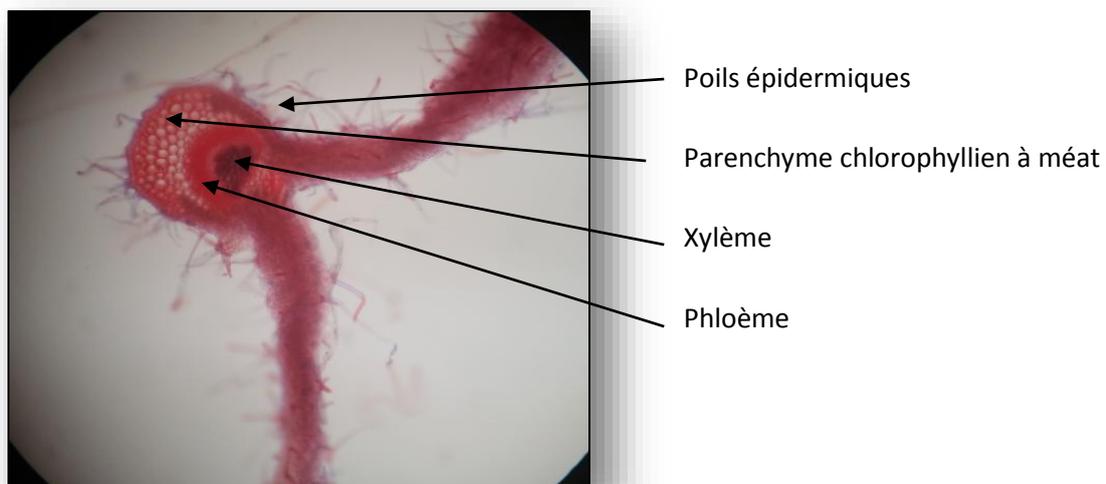


Figure 3.14: Coupe transversale d'un limbe au niveau de la nervure principale
 (Microscope photonique GX40)

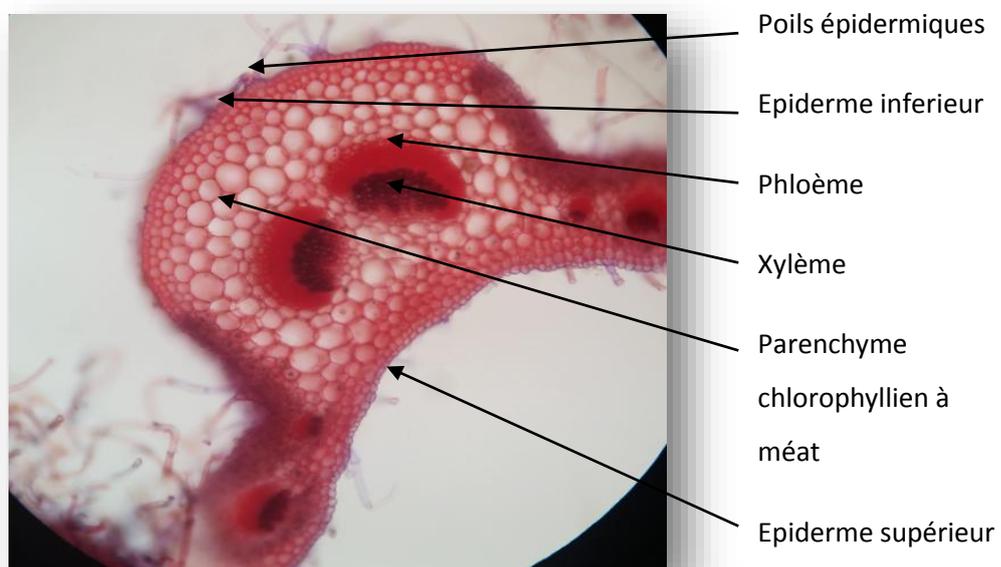


Figure 3. 15 : Coupe transversale de la feuille au niveau du pétiole
 (Microscope photonique GX40)

3.1.2.2. Tige

La tige est totalement recouverte de poils épidermiques (tecteurs et sécréteurs), la section de la tige est quadriforme à cause du dépôt de collenchyme au niveau des quatre angles de la tige. Les différents tissus observés sont représentés dans les figures 3.16, 3.16(A) et 3.17. La figure 3.17 représente une coupe histologique à l'état vital (sans coloration), elle montre différents tissus (protecteur, soutien, conducteur).

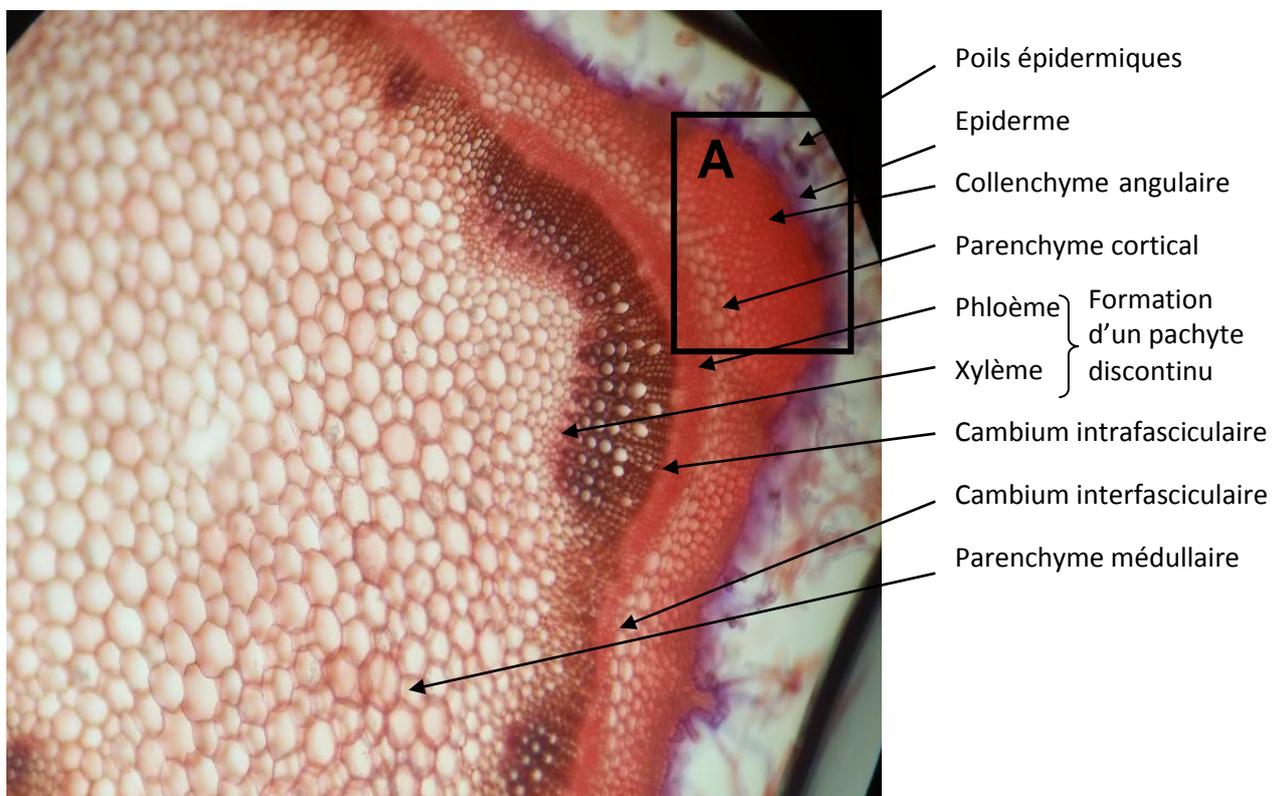


Figure 3.16 : Coupe transversale d'une tige de *Marrubium vulgare*
 (Microscope photonique GX10)

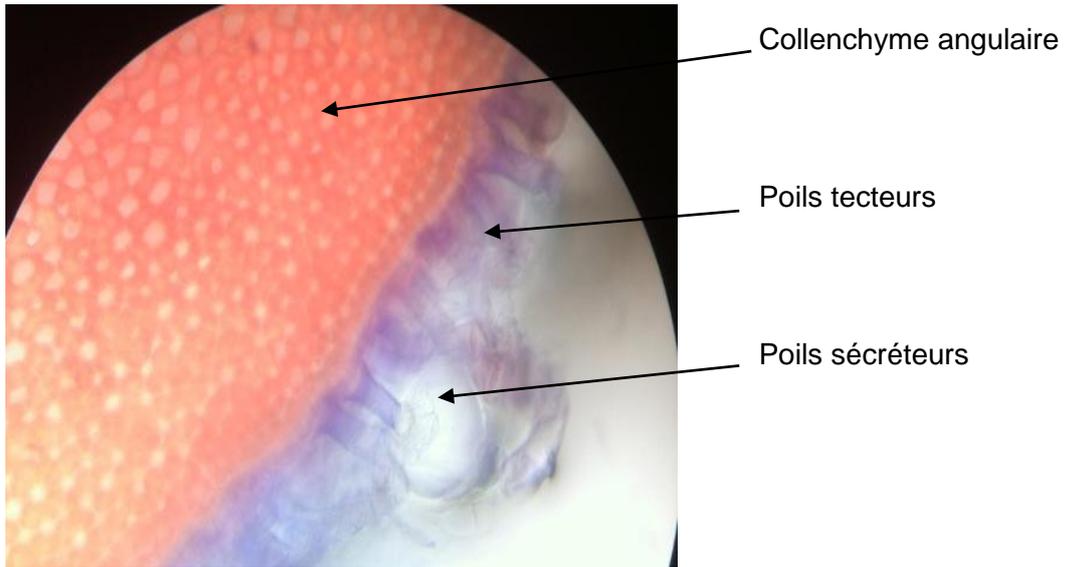


Figure 3.16 « **A** » : Détail du collenchyme et des poils à fort grossissement (X40)

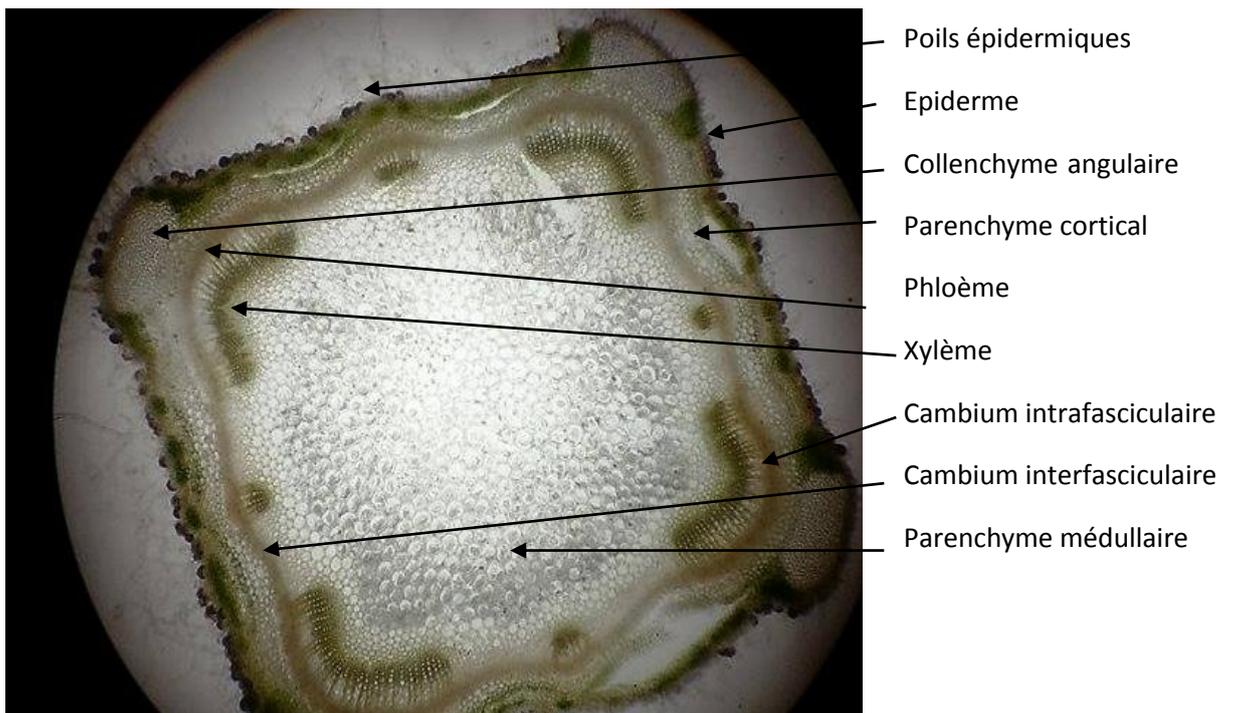


Figure 3.17 : Coupe transversale d'une tige de *Marrubium vulgare* à l'état vital
(Microscope photonique GX10)

3.2. Etude phytochimique

Les tests phytochimiques, nous ont permis d'obtenir les résultats suivants :

3.2.1. Détermination de la teneur en eau

Les résultats de la teneur en eau de Marrube blanc sont représentés dans les tableaux (Appendice C, tableaux 1 et 2).

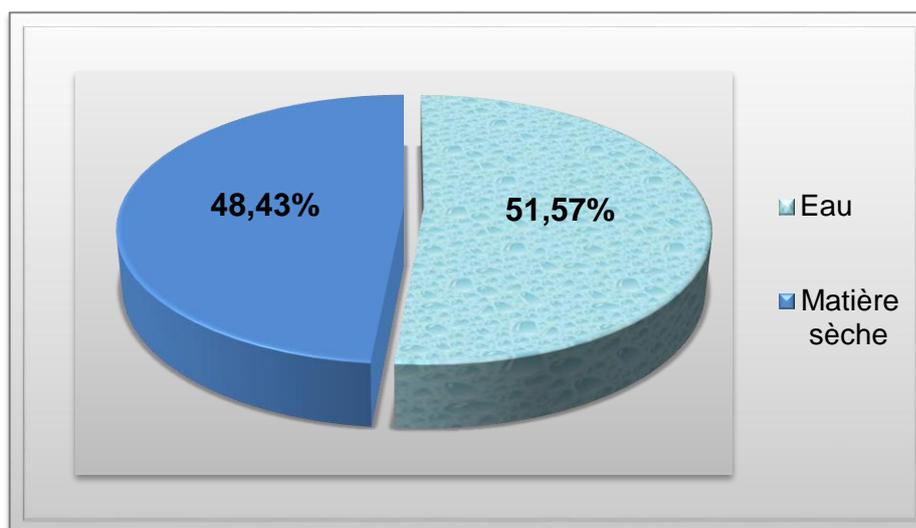


Figure 3.18 : Teneur en eau de *Marrubium vulgare* (Période de végétation)

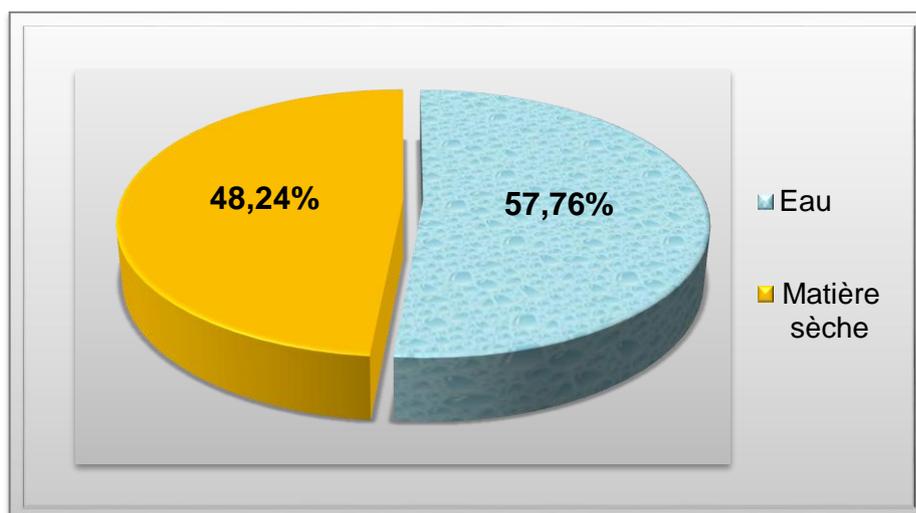


Figure 3. 19 : Teneur en eau de *Marrubium vulgare* (Période de floraison)

Les végétaux sont riches en eau, les analyses de nos échantillons (Figures 3.18 et 3.19) ont révélé un taux d'eau de 51,57% et 51,76 % respectivement durant les deux périodes de récoltes (Végétation et floraison).

Nous pouvons déduire que la moitié de l'échantillon fraîche est constituée d'eau. Les analyses statistiques ne révèlent pas une différence significative de la teneur en eau durant les deux périodes de récoltes ($p > 0,05$) ; la quantité d'eau dans l'échantillon ne varie pas selon la période de récolte.

3.2.2. Détermination du taux d'humidité

C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve. Les résultats de cette analyse ont révélé un taux d'humidité inférieur à 15% durant les deux périodes de récoltes (Tableau 3.2).

Tableau 3.2 : Teneur en humidité de la poudre

Poids de la poudre	1g
Teneur en humidité en période de végétation	9%
Teneur en humidité en période de floraison	10%

D'après nos résultats, nous constatons que les feuilles de *Marrubium vulgare* sont bien conservées durant les deux périodes avec un taux d'humidité ne dépassant pas 15%, ce qui est conforme à la pharmacopée européenne [147].

3.2.3. Détermination du taux de cendre

La calcination totale d'une prise d'essai de 2 g de poudre végétale nous a permis d'obtenir les figures suivantes (3.20 et 3.21) (Appendice C, tableaux 3 et 4).

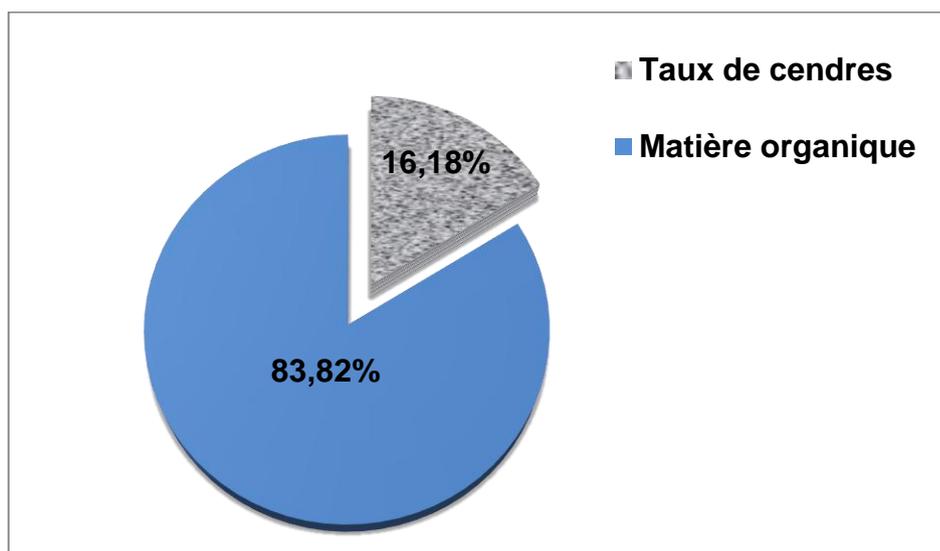


Figure 3. 20 : Taux de cendres de *Marrubium vulgare* (Période de végétation)

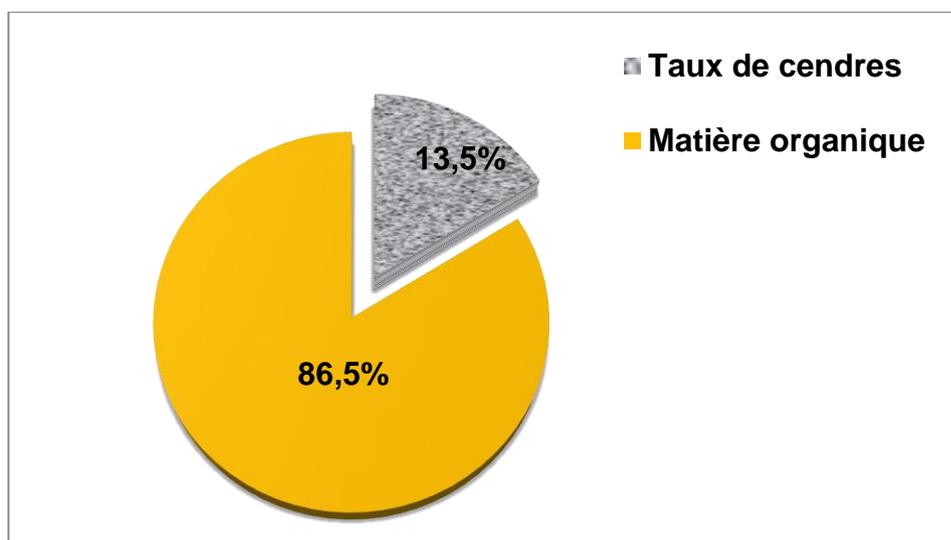


Figure 3. 21 : Taux de cendres de *Marrubium vulgare* (Période de floraison)

Après destruction de la matière organique par calcination de 2 g de la poudre, les cendres obtenues sont de couleur blanchâtres (Appendice C, figure 5) . Nous avons obtenu un taux de cendres en période de végétation de $16,18 \pm 0,0019\%$, suivi par un taux de $13,50 \pm 0,1266\%$ en période de floraison (Figures 3.20 et 3.21). Le traitement statistique des résultats a montré qu'il ya une différence très hautement significative entre la période de récolte et le taux de cendres ($p < 0,05$).

Ces résultats sont supérieures à ceux rapportés par la pharmacopée européenne en 2002 [147] qui est de 10 à 12% pour les plantes médicinales. Ainsi, ces résultats indiquent une forte teneur en minéraux chez le marrube blanc. Ceci concorde avec ses effets diurétiques signalés par Delille [14] et Amessis- Ouchemoukh et *al.*, [25].

La variation de la teneur en cendres peut être due aux :

- Période de récolte (Végétation/Floraison) ;
- Expositions à différentes conditions pédoclimatiques (richesse du sol en matière organiques et minérale, précipitations).

3.2.4. Caractérisation de quelques métaboliques secondaires de

Marrubium vulgare

La caractérisation phytochimique a pour but de mettre en évidence la présence ou l'absence des métabolites secondaires. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.4 où ils sont classés selon :

- Réaction forte : (++)
- Réaction faible : (+)
- Réaction négative : (-)

Tableau 3.4 : Screening phytochimique de *Marrubium.vulgare*

Période	Période de végétation	Période de floraison
Principes actifs		
Flavonoïdes	+	++
Tanins Catéchiques	++	++
Hydrolysables	++	++
Saponines	++ (IM : 200)	++ (IM : 143)
Alcaloïdes	+	++
Coumarines	++	+
Terpènes et Stérols	++	++
Anthocyanes	-	-

Ces résultats, montrent d'une façon qualitative que la plante contient diverses familles de produits naturels, renferme des composés phénoliques durant les deux périodes comme les flavonoïdes, les tanins (catéchiques, hydrolysables) et les coumarines, Elles contiennent aussi des saponines, les terpènes, stérols , les alcaloïdes, et absence de l'anthocyanes

Tous ces composés figurent dans la composition chimique de marrube blanc rapportée par Akther et *al.*, [34] exception faite pour les coumarines, et anthocyanes. Elberry et *al.*, [108] souligne que le marrube blanc est caractérisé par la présence de flavonoïdes, tanins, terpènes et stérols, avec l'absence d'alcaloïdes et saponines. Le screening phytochimique réalisé par Boutelis, [18] a montré également la présence des saponines, tanins catéchiques, les flavonoïdes, les terpènes et stérols et l'absence des alcaloïdes.

Ces différences de compositions peut être due aux : La localisation géographique de la plante étudiée ainsi au stade de développement et les techniques de caractérisations.

3.2.5. Extraction

L'extraction au Soxhlet nous a permis d'obtenir deux extraits, l'extrait éthéropétrolique et l'extrait méthanolique. Dans notre expérimentation nous nous sommes orientés vers l'étude de l'extrait méthanolique à cause du rendement élevé de l'extrait méthanolique durant les deux périodes testées, Plusieurs auteurs ont montré la richesse de l'extrait méthanolique en métabolites secondaires [49], [32], [136], [117].

3.2.5.1. Rendement de l'extrait méthanolique durant les deux périodes

Les résultats obtenus concernant le rendement de l'extrait brute méthanolique durant les deux périodes sont illustrés dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 : Aspect, couleur et rendement de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare*

	Extraits	Couleur	Aspect	Poids de l'extrait (g)	Rendement
Période de végétation	EMOHv	Vert	Collant	5,12	17,1%
Période de floraison	EMOHf	Vert marron	Collant	8,23	27,46%

La préparation de l'extrait brute méthanolique de la drogue a donné un rendement de l'ordre de 5,12 g, en période de végétation, de couleur verte et d'aspect collant. En période de floraison une quantité de l'extrait méthanolique est de 8,23g de couleur vert marron ayant un aspect collant (Tableau 3,5).

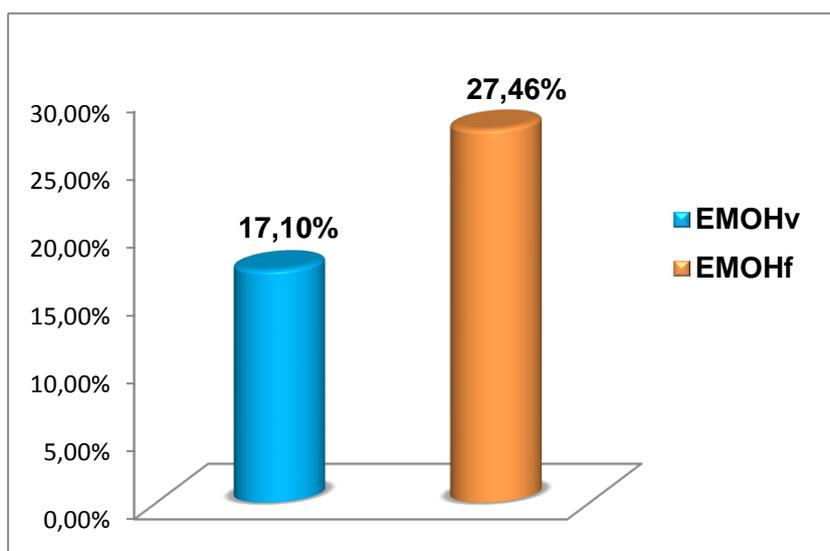


Figure 3.22: Rendement de l'extrait méthanolique

Les résultats obtenus montrent que le rendement des extraits méthanoliques durant la période de floraison de *Marrubium vulgare* est plus élevé avec un taux de 27,46%, comparé à la période de végétation où nous avons enregistré 17,10% (Figure 3.22). Nous remarquons que l'extrait méthanolique en période de floraison est plus riche en métabolites secondaires que celui de la période de végétation.

Les résultats obtenus comparés aux travaux de Boutelis, [18] montrent un rendement de 24,34%. Pukalskas et *al.*, [32] soulignent que le rendement de l'extrait méthanolique est de 20,1%, avec la même espèce mais en période de floraison. Un rendement de 39,2% de l'extrait brute a été obtenu à partir de la partie aérienne de la même espèce lors d'une étude entreprise par Kanyonga et *al.*, [136]. En effet, ces auteurs ont montré que les extraits méthanoliques de cette espèce sont très riches en métabolites secondaires.

Nous avons remarqué que nos résultats sont proches à ceux retrouvés par ces chercheurs en période de floraison [18], [32], [136].

Aucun travail de recherche concernant l'espèce *Marrubium vulgare* n'a été effectué en période de végétation, pour cela nous n'avons pas pu faire une comparaison.

Quelque soit la méthode d'extraction appliquée, elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, et de la bioactivité des principes actifs.

Les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante de même espèce et d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant.

Dans la présente étude, la méthode de Soxhlet permet d'accélérer le processus d'extraction et d'obtenir un bon rendement d'extraction de polyphénols. Cependant cette méthode est très appréciée car elle permet de faire des extractions en continu tout en restant simple et relativement peu coûteuse [111], [18].

3.2.5.2. Analyses des l'extraits méthanolique par CCM

Pour l'analyse qualitative du contenu phénolique de nos extraits méthanoliques durant les deux périodes (Végétation/Floraison) du marrube blanc nous avons eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM) puisqu'elle est l'une des méthodes de séparation des différents constituants d'un extrait végétal et qui est simple à mettre en œuvre.

Dans notre étude, la CCM nous a permis d'avoir une très bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des taches (Figure 3.23), où nous avons pu mettre en évidence de nouveaux composés.

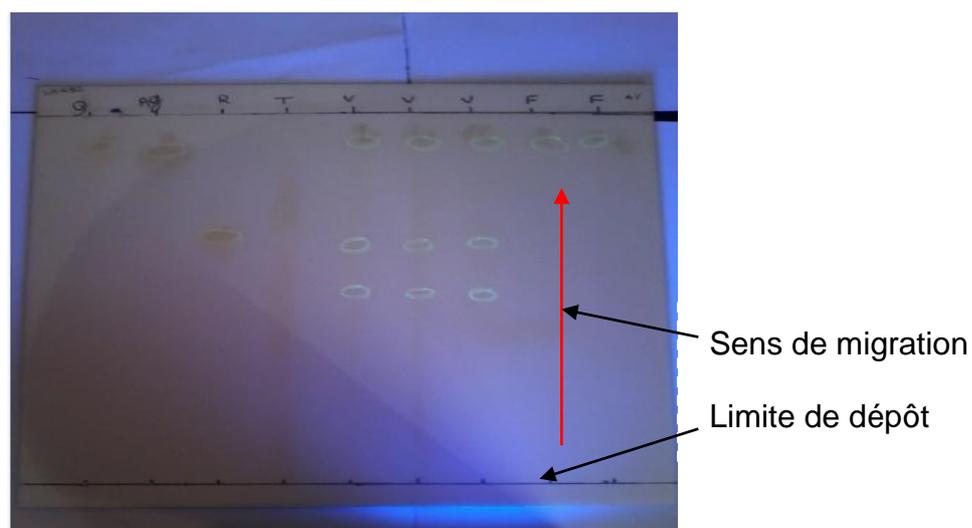


Figure 3.23. Plaque de CCM prise après révélation à la lumière UV (318 nm) pour les extraits et les témoins

Nous avons utilisé la CCM de manière qualitative pour caractériser la présence ou l'absence des composés actifs les plus répandus et qui seraient présents dans *Marrubium vulgare*. Après révélation à la lumière UV (318 nm), nous avons obtenu les résultats suivants (Tableau 3.6 et 3.7).

Tableau3.6 : Chromatographie sur couche mince (Témoins)

Témoin	couleur	Rf	Classes phénoliques
Acide gallique	Grise	0,89	Acide phénol
Quercétine	Jaune	0,90	Flavonoïde (flavonol)
Rutine	Jaune	0,65	Flavonoïde (flavone)
Acide tannique	Marron	/	Acide phénol

Tableau3.7 : Chromatographie sur couche mince des extraits méthanoliques
(Périodes de végétation et de floraisons)

EMOH en période de végétation			EMOH en période de floraison		
Couleur	Rf	Classes phénoliques	Couleur	Rf	Classes phénoliques
Vert	0,90	Flavonoïde (Quercétine)	Vert	0,90	Flavonoïde (Quercétine)
Vert	0,65	Flavonoïde (Rutine)	/	/	Absent
Vert	0,49	Non identifié			

L'étude de l'identification des composés phénoliques de notre plante et à l'aide de quelques témoins utilisés (Tableau3.6), nous a permis de mettre en évidence la présence de la quercétine et de la rutine, appartenant à la classe des flavonoïdes. Nous avons enregistré l'absence de l'acide tannique et de l'acide gallique pour l'EMOH en période de végétation. En période de floraison nous avons noté seulement de la quercétine.

Les analyses chromatographiques réalisées par Ghedadba et *al.*, [26], ont permis d'identifier la présence de la quercétine et l'acide gallique.

Les résultats de Boutlelis, [111] ont montré la présence en général des flavonoïdes et des tanins en période de floraison sur la même espèce *Marrubium vulgare*.

3.2.5.3. Analyses de l'extrait méthanolique par HPLC

Les profils HPLC représentés ci-dessus montrent des composés phénoliques mentionnés par leurs pics et leurs temps de rétention dans les spectres des deux extraits étudiés (Figures 3.24 et 3.25). Les résultats détaillés

sont présentés dans le tableau 3.8 (Appendice C) pour les témoins (étalons) et les tableaux 3.9 et 3.10 pour les extraits méthanoliques testés.

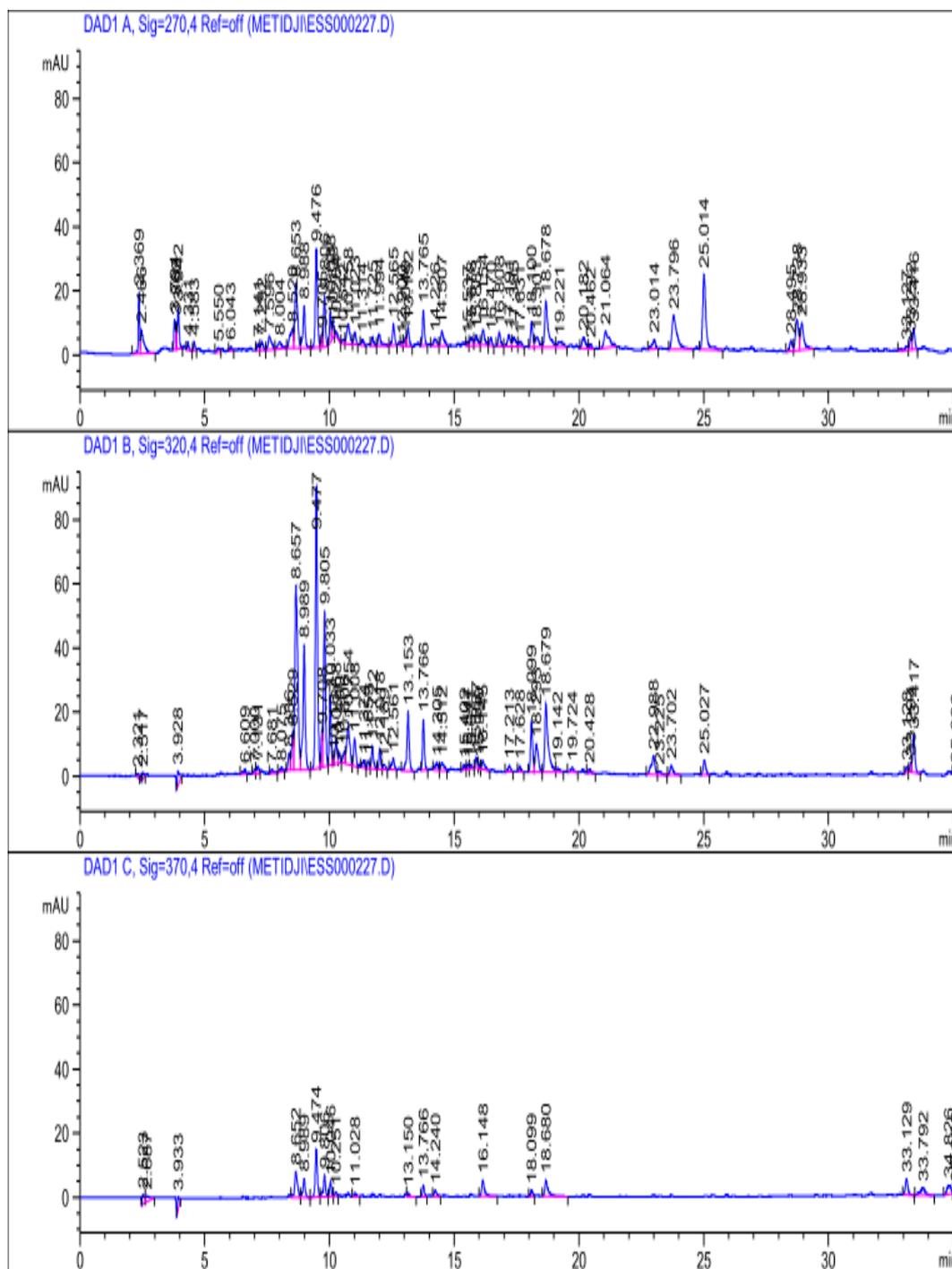


Figure 3.24: Chromatogramme HPLC de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* (Période de végétation)

Tableau 3.9 : Temps de rétention des composés phénoliques de *M. vulgare*
(Période de végétation)

Période de végétation				
N°de pic	Temps de rétention	λ (nm)	Aire (%)	Composés
1	2,5	370	3,27	Acide gallique
2	2,7	370	4	Acide tannique
8	8,1	320	0,29	Acide chlorogénique
11	8,66	320	15,20	Non identifié
11	7,3	270	0,63	Catéchine
12	8,99	320	7,98	Non identifié
13	9,48	320	16,15	Rutine
22	10,3	320	1,33	Vanilline
15	9,8	320	8,07	Non identifié
16	10,03	320	3,44	Non identifié
30	13,8	320	2,65	Non identifié
31	13,04	270	0,58	Quercétine
35	14,50	270	1,50	Acide coumarique
41	18,1	320	2,88	Non identifié
43	18,68	370	8,45	Non identifié
54	25,01	270	8,15	Non identifié

Les profils chromatographiques (Figure 3.24) représentés dans le tableau 3.9, nous a permis d'enregistrer la présence de 16 pics à 03 longueurs d'ondes différentes, ce qui signifie la présence de molécules actives au niveau de cet extrait méthanolique avec des proportions différentes. L'analyse d'HPLC de *Marrubium vulgare*, révèle que l'extrait méthanolique est très riche en métabolites secondaires ce qui lui confère différentes propriétés thérapeutiques.

La comparaison des temps de rétention des étalons (Tableau 3.8) a permis l'identification de différents composés phénoliques dans l'extrait méthanolique durant la période de végétation de *Marrubium vulgare*.

Notons que les résultats obtenus montrent la présence de la rutine (9,48mn) identifiée pour la première fois comme nouveau composé dans les feuilles de *Marrubium vulgare* durant notre expérimentation. Par ailleurs, nous avons enregistré la présence de l'acide gallique (2,5mn), l'acide chlorogénique (8,1mn), l'acide tannique (2,7mn), l'acide coumarique (14,5mn), la quercétine (13,04mn), la vanilline (10,3mn) et la catéchine (7,3mn). Huit composés non identifiés présentant différents temps de rétention avec des proportions différentes ont été décelés.

Les profils chromatographiques de l'extrait méthanolique durant la période de floraison des feuilles de *M. vulgare* analysés est représenté au niveau de la figure 3.25. Les résultats qualitative des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau 3.10.

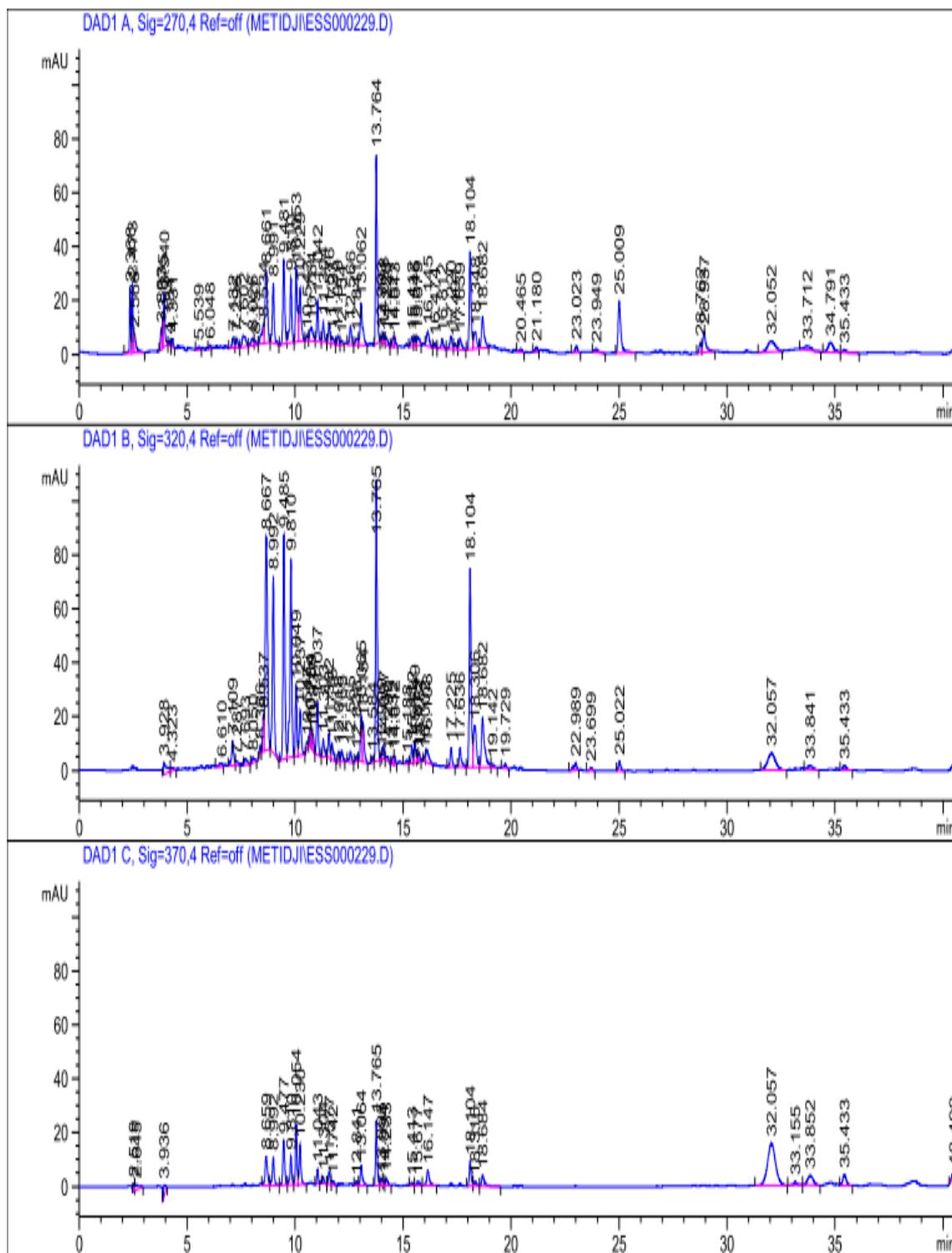


Figure 3.25 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* (Période de floraison).

Tableau 3.10 : Temps de rétention des composés phénoliques de *M. vulgare* (Période de floraison)

Période de floraison				
N°de pic	Temps de rétention	λ (nm)	Aire (%)	Composés
2	2,5	270	2,55	Acide gallique
5	7,3	320	0,23	Catéchine
8	10,05	370	6,96	Non identifié
9	10,3	370	1,20	Vanilline
10	8,66	320	12	Non identifié
11	8,99	320	7,58	Non identifié
12	9,48	320	10,1	Rutine
13	9,8	320	8,91	Non identifié
15	8,1	270	0,25	Acide chlorogénique
25	18,68	370	2,58	Non identifié
26	32,1	370	25,17	Non identifié
31	13,8	320	10,9	Non identifié
33	13,0	270	3,5	Quercétine
30	13,6	320	0,17	Acide salicylique
38	14,5	270	0,49	Acide coumarique
46	18,1	320	9,16	Non identifié
56	25,01	270	4,86	Non identifié

Nous avons déduit que l'EMOHf, est riches en métabolites secondaires, ces derniers sont connus par des composés phénoliques ; la rutine, la quercétine, la catéchine, l'acide salicylique, l'acide coumarique, l'acide chlorogénique, acide gallique, vanilline et d'autres composés non identifiés.

En comparant les résultats obtenus de l'EMOHf avec l'EMOHv, nous avons trouvé les mêmes composés avec des proportions différentes et la

présence de l'acide salicylique dans l'EMOHf et la présence de l'acide tannique dans l'EMOHv.

Nous avons noté aussi la présence pour la première fois de la rutine en période de floraison durant notre expérimentation.

Les résultats obtenus comparés aux travaux de Ghedadba et *al.*, [26] ont montré la présence de l'acide gallique, quercétine, et les composés phénoliques spécifiques de la plante, Forsythoside B, Ballotétroside, verbascoside. Par manque d'étalons de ces derniers composés nous n'avons pas pu les identifier lors de notre étude.

3. 2.6. Dosages des métabolites secondaires

L'étude quantitative des extraits méthanoliques des dosages spectrophotométriques avait pour objectif, la détermination de la teneur totale en composés phénoliques notamment les flavonoïdes et les tanins.

3.2.6.1. Dosage des composés phénoliques totaux

Une corrélation hautement significative entre la concentration de l'acide gallique et l'absorbance moyenne ($r=0,9903$) a été enregistré. Ainsi la courbe d'étalonnage montre la linéarité de l'absorbance en fonction des différentes concentrations. Les mesures de la densité optique ont été effectuées à la longueur d'onde de 765 nm (Figure 3.26).

Les composés phénoliques sont des molécules bioactives très recherchées parce qu'elles sont réputées pour leurs excellentes propriétés antioxydants et antimicrobiennes [139]. Pour ces raisons, un dosage de ces composés a été effectué pour les deux périodes (Végétation/Floraison), les teneurs obtenues sont exprimées en mg équivalent acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS), (Figure3.27).

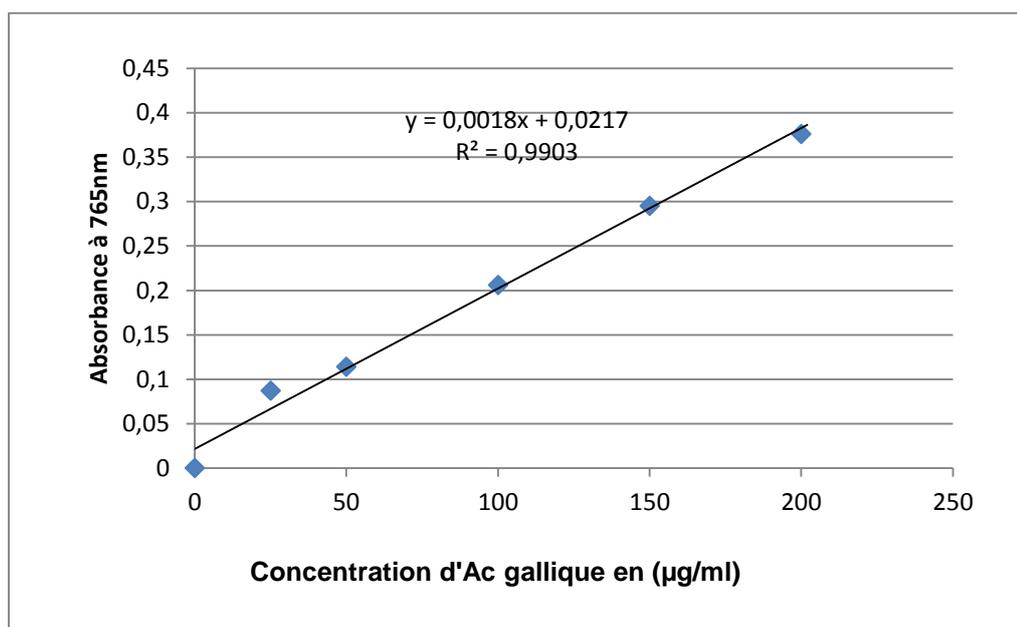


Figure 3.26 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

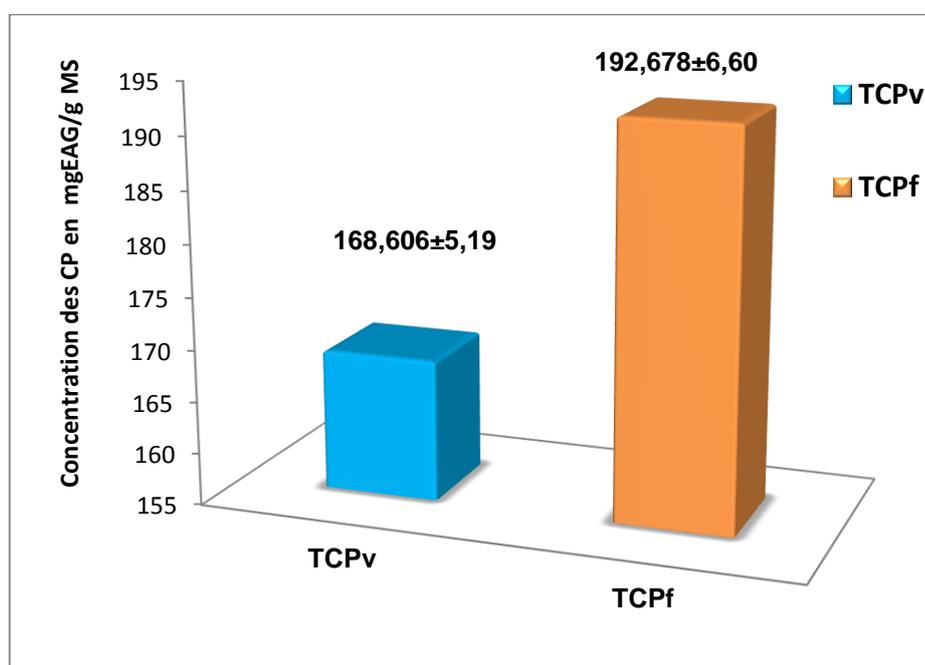


Figure 3.27: Teneur des composés phénoliques totaux

Les résultats de la teneur en composés phénoliques totaux montrent que l'extrait méthanolique durant la période de la floraison est plus riche avec un taux de $192,678 \pm 6,60$ mgEAG /gMS, comparé à l'extrait méthanolique en période de végétation avec un taux plus faible de $168,606 \pm 5,19$ mg EAG/g MS.

Après une analyse statistique ANOVA (Appendice C), nous avons constaté qu'il y'a une différence hautement significative ($p < 0,05$) entre la période de récolte et la teneur moyenne en composés phénoliques. Nous pouvons expliquer ce phénomène par le fait qu'en passant de la période de végétation à la floraison, les feuilles séchées du marrube blanc présentent une augmentation des concentrations moyennes en composés phénoliques totaux.

Nos travaux concordent avec ceux de Bouterfas et *al.*, [112], où ils signalent une concentration de 189 mg EAG/g MS durant la période de mai 2010 sur la même espèce *Marrubium vulgare*. Ces mêmes auteurs, Bouterfas et *al.*, [115], ont montré que les feuilles de *Marrubium vulgare* en période d'avril 2012, possèdent une concentration moyenne plus élevée en polyphénols totaux avec 293.34 ± 14.60 mg EAG/g MS.

Les travaux de Amessis-Ouchemoukh et *al.*, [25], Aouadhi et *al.*, [114] et Wojdylo et *al.*, [33], montrent que l'extrait méthanolique possède respectivement une faible concentration en composés phénoliques totaux avec $40,57 \pm 1,9$ mg EAG/g MS, $26,8 \pm 0,01$ mg EAG/g MS et 3.86 ± 0.05 mg EAG/g MS durant la période de floraison, comparés aux résultats obtenus de nos essais avec $192,678 \pm 6,60$ mgEAG /g MS (période de la floraison) $168,606 \pm 5,19$ mg EAG/g MS (période de la végétation).

Cette variabilité dans les résultats pourrait être liée aux conditions climatiques du biotope de l'espèce ou aux différentes méthodes suivies lors de l'extraction.

En effet, la méthode de Soxhlet utilisée lors de nos analyses permet d'accélérer le processus d'extraction et d'obtenir un bon rendement d'extraction de polyphénols [110].

La teneur élevée en polyphénols dans l'extrait méthanolique est liée à la solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires [47], [79].

Des résultats ont prouvé que le méthanol était le meilleur solvant utilisé pour extraire les composés phénoliques, suivi par l'éthanol et finalement par l'eau [117].

Les variations qualitatives et quantitatives des composés phénoliques peuvent être particulièrement marquées au cours de la vie de la plante. Bien qu'il n'y ait pas de règle générale stricte, on peut cependant révéler quelques faits fréquemment retrouvés :

- Les teneurs en composés phénoliques sont quelque fois élevées dans les organes jeunes et diminuent ensuite au cours de la croissance.
- A l'opposé, certains organes montrent de fortes concentrations en phénols au stade adulte [47].

La contamination du végétal par des microorganismes pathogènes entraîne également une forte augmentation des teneurs en composés phénoliques, correspondant à la mise en place de mécanismes de défense de la plante.

3.2.6.2 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est réalisé par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) décrite par Bahorun et *al.*, (1996) [99].

La quercétine prise comme contrôle positif, nous a permis de réaliser une courbe d'étalonnage avec R^2 égal à 0,988 ; résultat qui a permis de

calculer la teneur en flavonoïdes pour les extraits méthanoliques qui est exprimé en mg EQ/g MS (Figure 3.28).

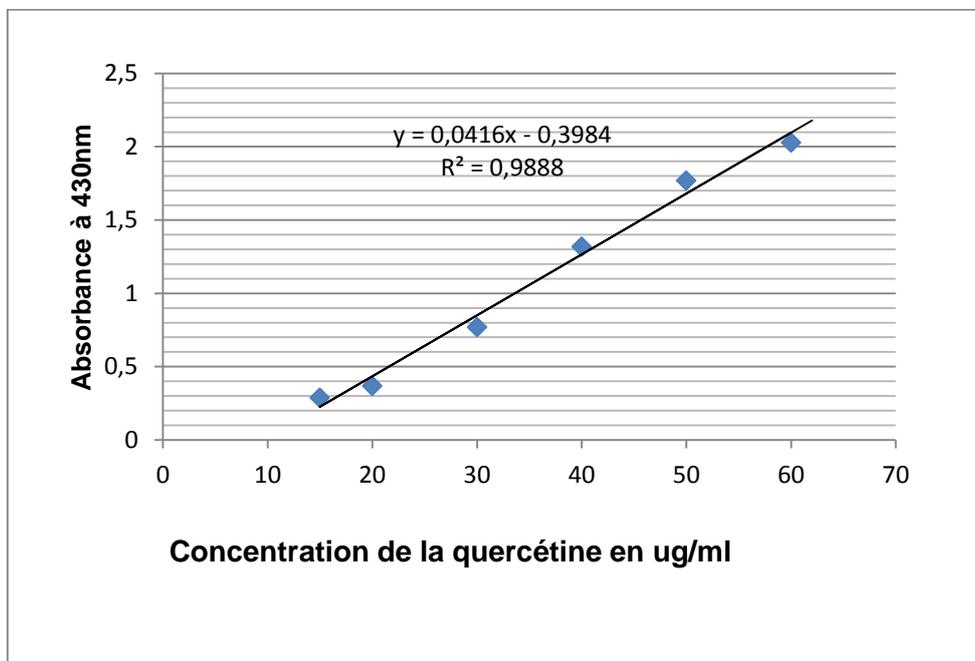


Figure 3.28: Courbe d'étalonnage de la quercétine

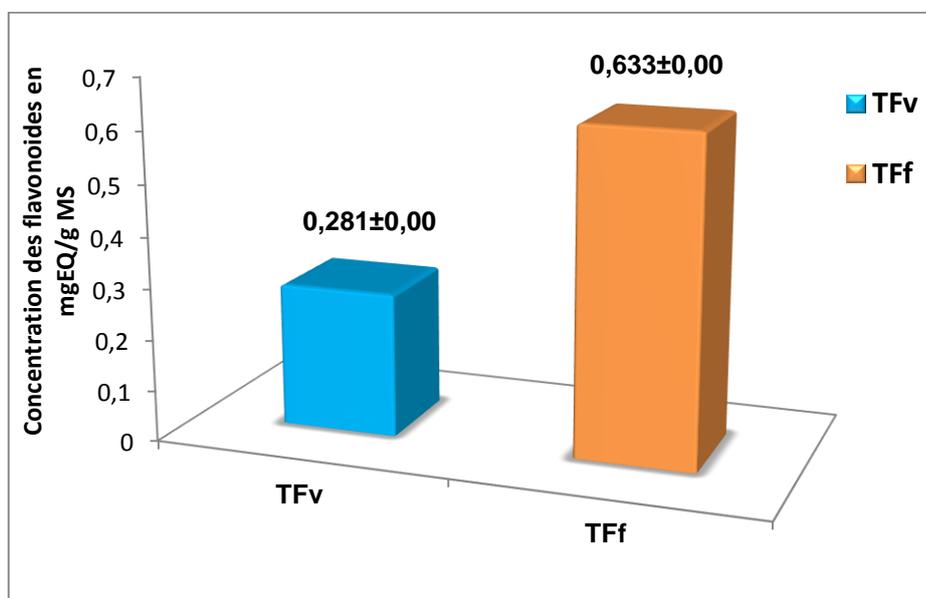


Figure 3.29 : Teneur en flavonoïdes

Les résultats illustrés dans la figure 3.29 montrent que la teneur en flavonoïdes durant la période de floraison est élevée, avec une concentration de $0,633\text{mg}\pm 0,00$ EQ/ g MS comparée à la période de végétation où nous enregistrons une teneur faible avec $0,280 \pm 0,00\text{mg}$ EQ/g MS.

Les analyses statistiques de l'ANOVA (Appendice C), montrent qu'il y'a une différence très hautement significative, entre la teneur en flavonoïdes et la période de récolte ($p < 0,0001$). Nous pouvons déduire que la concentration en flavonoïdes dans les feuilles séchées du *Marrubium vulgare* augmente graduellement durant la période de la végétation à la période de la floraison. Notons que les feuilles sèches accumulent des quantités plus importantes en flavonoïdes.

Les résultats obtenus comparés aux travaux de Bouterfas et *al.*, [112], ont montré que les flavonoïdes présentent une teneur plus élevée avec (68mg EC/g MS) durant la période de récolte mai 2010. Durant la période d'avril 2012 Bouterfas et *al* [115], soulignent que les feuilles de *Marrubium vulgare*, possèdent une concentration plus élevée avec $79,52\pm 0,55\text{mg}$ EC/g MS comparée à nos résultats durant la période de floraison.

Les travaux d'Amessis-Ouchemoukh et *al.*, [25] ont montré aussi une concentration élevée en flavonoïdes est de $10,249\pm 0,083\text{mg}$ EQ/g MS.

Par ailleurs il est difficile de comparer nos résultats avec ceux observés dans la bibliographie ; l'utilisation de différentes méthodes d'extraction et de quantification réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études. En plus, plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en flavonoïdes car des études montrent que les facteurs extrinsèques tels que les facteurs , climatiques et environnementaux, le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante ont une nette influence sur le contenu en flavonoïdes des plantes [120], [121], [122].

3.2.6.3. Dosage des tanins condensés

Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant la catéchine comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EQC/g MS) (Figure 3.30).

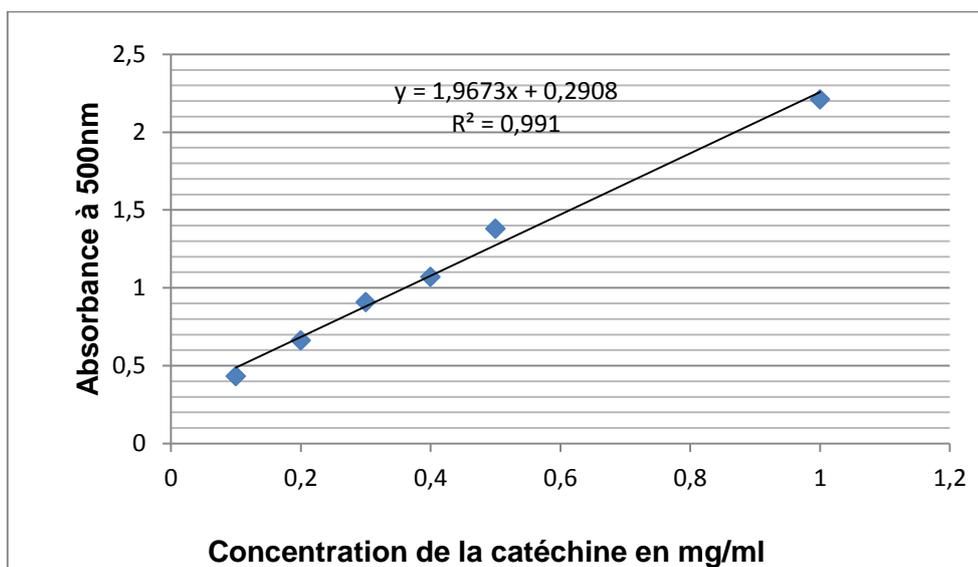


Figure 3.30 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

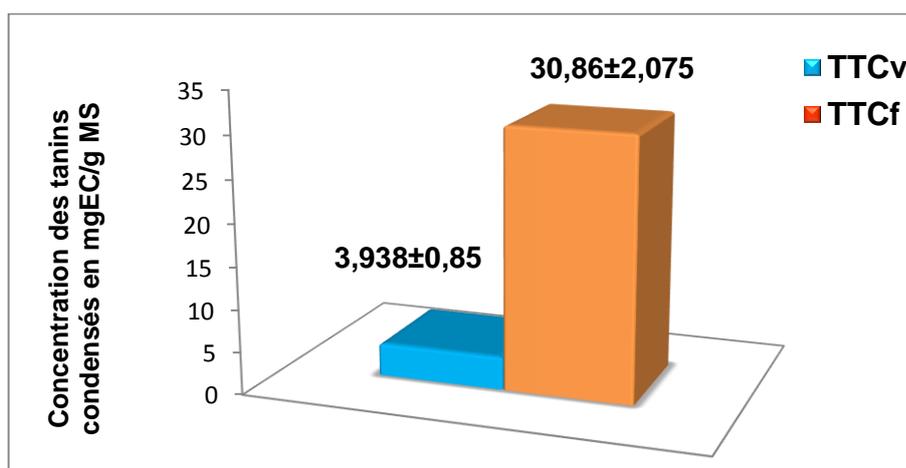


Figure 3.31: Teneur en tanins condensés

La teneur en tanins condensés des deux extraits méthanoliques de la plante étudiée varient de 3,93 mg EC/g MS en période de végétation et 30,86 mg EC/g MS en période de floraison (Figure 3.31). La teneur la plus élevée est celle des feuilles séchées en période de floraison avec une concentration de $30,86 \pm 2,075$ mg EC /g MS, suivi par les feuilles en période de végétation avec une concentration de $3,938 \pm 0,85$ mg EC /g MS.

Les traitements statistiques (ANOVA) montrent qu'il y a une différence très hautement significative entre la concentration moyenne des tanins condensés et la période de récolte ($p < 0,000$). Nous pouvons déduire que durant le cycle végétatif et reproducteur de la plante nous enregistrons une augmentation importante de la quantité des tanins condensés.

Les travaux de Amessis-Ouchemoukh et *al.*, [125] montrent une faible concentration en tanins condensés est de $10,249 \pm 0,083$ mg EC/g MS est enregistrée durant la période de floraison par rapport a nos résultats . Nous avons remarqué que nos résultats sont proches à ceux de Bouterfas et *al.*, [115], où la concentration moyenne atteint $28,15 \pm 0,80$ mg EC/g MS en période de mois d'avril avec l'extrait cétonique à 60%.

La distribution des métabolites secondaires peut varier pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques extrêmes (température élevée, sécheresse, salinité, etc.) ou le stress de prédation (microorganismes, insectes, etc.) qui stimule la biosynthèse des métabolites secondaires [112].

3.3. Tests biologiques

3.3.1. Activité antioxydante

La méthode de DPPH a été choisie, en raison de sa simplicité, rapidité, sensibilité et de sa reproductibilité [123]. Le radical libre de DPPH est de couleur violet sombre, cependant lorsqu'il est piégé par des substances

antiradicalaires, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle. Ce virage de couleur et son intensité dépend de la nature, de la concentration et de la puissance de la substance antiradicalaire.

L'inhibition du DPPH radicalaire a été évaluée pour l'extrait méthanolique en deux périodes de la plante testée *Marrubium vulgare* et pour les standards (rutine, quercétine, α tocophérol (vitamine E).), les résultats sont présentés dans les tableaux (Appendice C, figures 5,6 et 7). Les pourcentages d'inhibitions du radical libre DPPH est représenté en fonction des concentrations des différents extraits et standards (Figures 3.32, 3.33, 3.34, 3.35 et 3.36).

Les résultats exprimés en pourcentage d'activité antiradicalaire révèlent que tous les substrats testés sont des antiradicalaires.

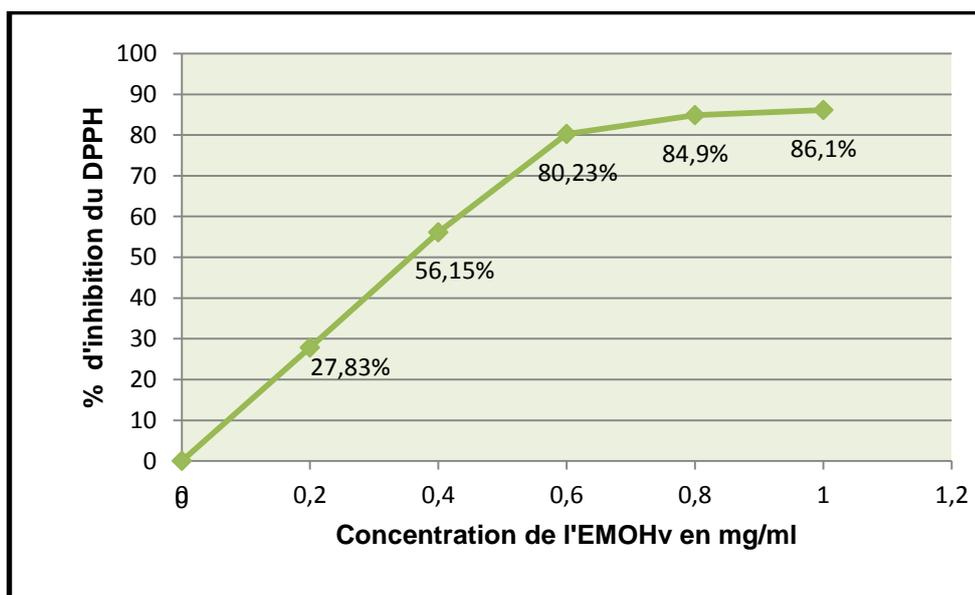


Figure 3. 32 : Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction de la concentration de l'EMOHv

Le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration d'extrait méthanolique en période de végétation. Ce pourcentage atteint 80,23% pour une concentration de

0,6mg/ml jusqu'à la stabilité du radical (Figure 3.32), notons qu'à une concentration de 1mg/ml de l'extrait peu neutralisé presque la totalité du radical à 86, 1%.

Le manque d'étude de la plante de *Marrubium vulgare* en période de végétation ne nous a pas permis de faire une comparaison avec les travaux de d'autres chercheurs. Pour cela, une comparaison de l'extrait méthanolique en période de floraison a été réalisée avec les standards préparés (étalons).

L'extrait méthanolique en période de végétation possède une très forte capacité de neutralisation du radical libre du DPPH. Cette capacité est expliquée par la présence de certains métabolites secondaires actifs analysés par l'HPLC en période de végétation.

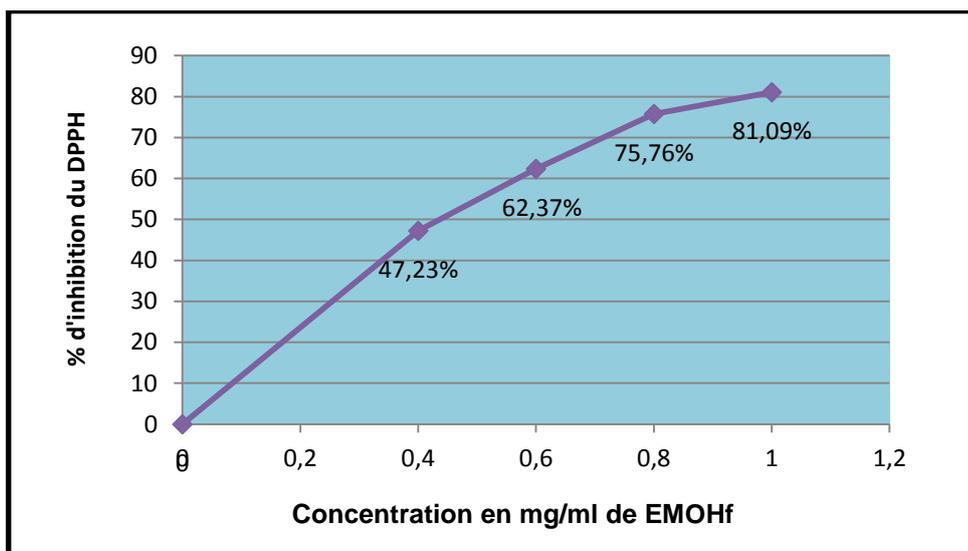


Figure3.33: Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction de la concentration de l'EMOHf

Le pourcentage d'inhibition du radical libre (DPPH) augmente en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique en période de floraison, ce taux atteint 81,09% pour une concentration de 1mg/ml (Figure 3.33). Nous pouvons expliquer cette forte concentration de l'extrait méthanolique en période de

floraison par la richesse de l'extrait en métabolites secondaires selon les analyses d'HPLC effectuées en période de floraison.

Selon Molyneux, [125] les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leurs structures chimiques idéales.

Les résultats obtenus par piégeage du radical libre DPPH dans le présent travail révèlent que l'extrait méthanolique en période de végétation (0,6mg/ml à neutralisé 80,23% du radical libre) est plus actif que l'extrait méthanolique en période de floraison (1mg/ml à neutralisé 81,09% du radical libre), ceci est probablement lié à la complexité des extraits méthanoliques en substances polyphénoliques y compris les tanins et les flavonoïdes ainsi que la synergie existante entre eux entraînant une meilleure activité antioxydante [140].

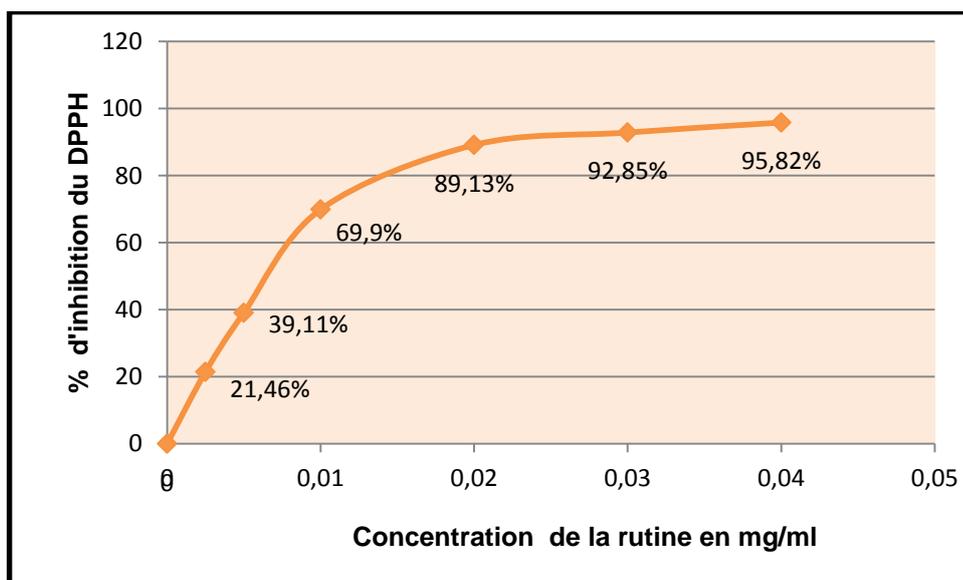


Figure 3.34. Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction de la concentration de la rutine

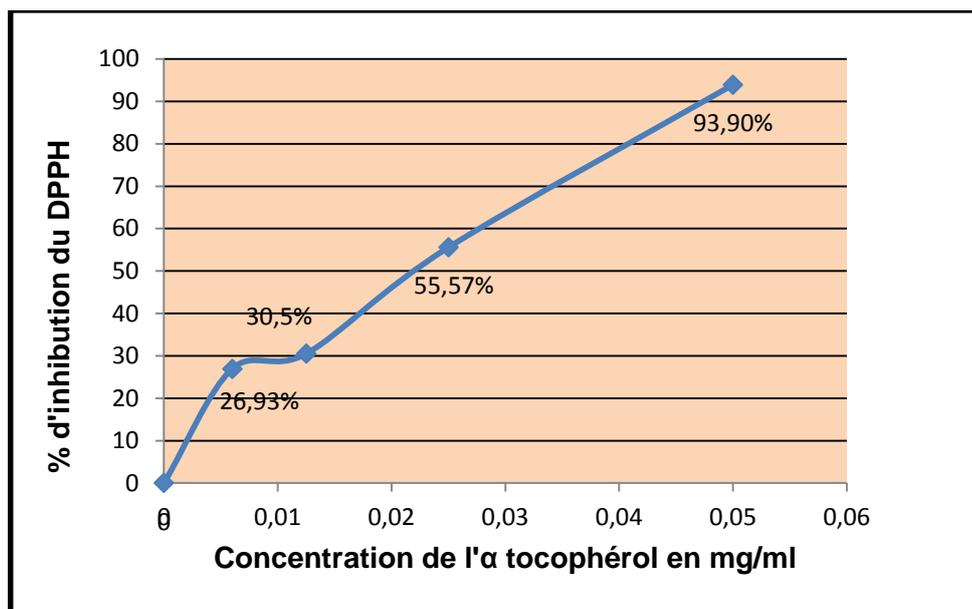


Figure 3.35 : Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction de la concentration de l' α tocophérol

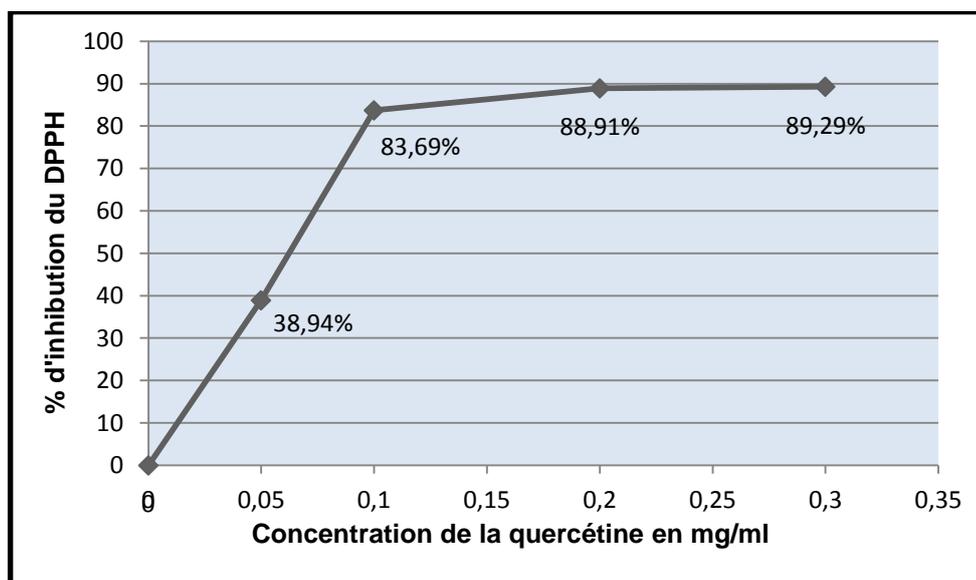


Figure 3.36 : Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction de la concentration de quercétine

Les figures 3.34, 3.35 et 3.36, illustrent respectivement les variations de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration de la

quercétine, la rutine et l' α tocophérol. Leurs activités sont plus importantes que celle des produits testés. On remarque aussi que les courbes ont la même allure. En effet, plus on augmente la concentration, plus l'activité antiradicalaire augmente jusqu'à atteindre un palier. Au-delà de ce maximum, l'activité reste constante.

La rutine représente une meilleure réduction du radical libre (DPPH), ce pouvoir atteint 95,82% pour une concentration de 0,04mg/ml (Figure 3.34), suivi par α tocophérol à 93,90% pour une concentration de 0,05mg/ml (Figure 3.35) et la quercétine atteinte 89,29% pour une concentration de 0,3mg/ml (Figure3.36).

Ce phénomène est interprété par le transfert de(s) électron(s) célibataire(s) qui sont localisés dans l'orbital externe du DPPH. Après avoir atteint une concentration donnée, l'antioxydant va réagir complètement avec le radical, et quand nous augmentons la concentration, l'activité antioxydante reste constante puisque cela s'accompagne par la saturation des couches électroniques du radical [26].

3.2.1. Evaluation d'IC₅₀

La capacité antioxydante de nos extraits est déterminée à partir des IC₅₀, paramètres couramment utilisés pour mesurer l'activité antioxydante.

L'IC₅₀ c'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH dans une période de temps défini, elle a été calculée par la régression linéaire, des pourcentages d'inhibition calculée en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés (Appendice C, figures 8,9,10,11 et 12).

Une valeur faible de IC₅₀ correspond à une activité antioxydante plus élevée de l'extrait [126].

Les valeurs des IC_{50} , trouvées pour tous les extraits testés de *Marrubium vulgare* durant les deux périodes et pour les standards sont représentées dans la figure 3.38.

De ces résultats, nous pouvons déduire que la réduction de 50% du DPPH a été atteinte pour tous les extraits testés et les standards.

Un test préliminaire de Levène (Appendice C) est établi pour vérifier l'homogénéité des variances, avec $p = 0,239 > 0,05$. Les variances des cinq échantillons sont donc comparables (échantillons testés et les 3 étalons).

L'Analyse statistique (ANOVA) (Figure 3.37) met en évidence des différences très hautement significatives avec ($p = 0,000000$). Un test de comparaison post-hoc de Scheffe nous donne un déploiement des groupes ayant des concentrations d'inhibition à 50% (appendice C).

En effet, l'analyse d'ANOVA a montré, qu'il y a une différence hautement significative ($p < 0,008$) entre les moyennes des IC_{50} des extraits méthanoliques et la période de récolte.

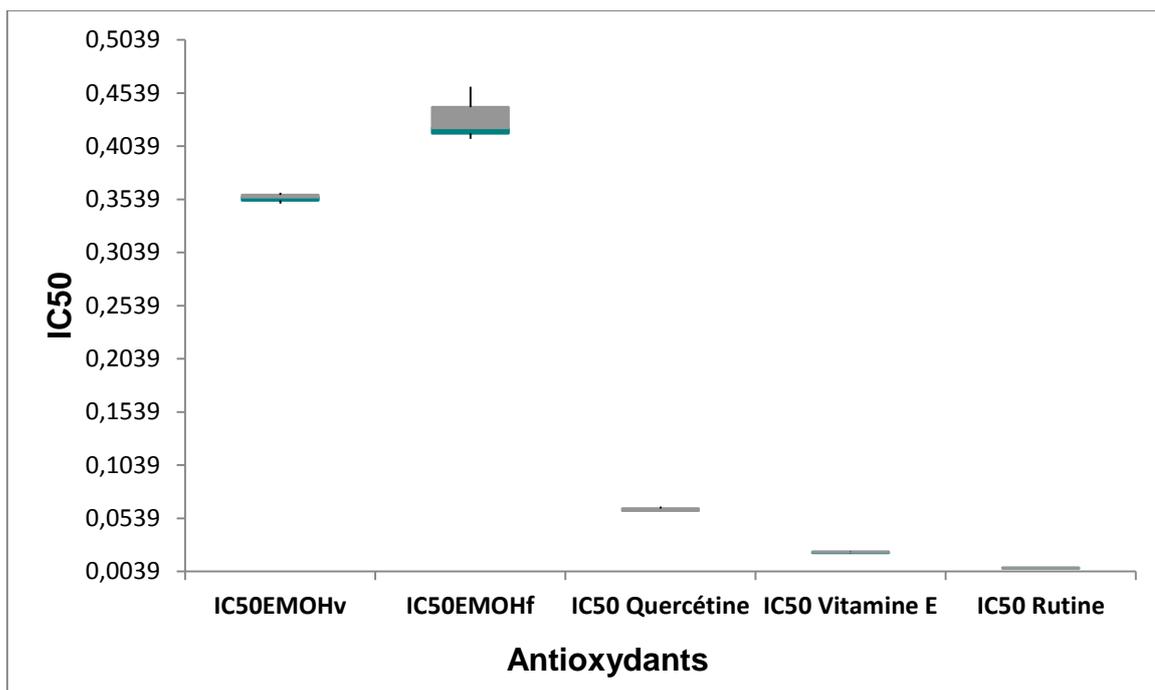


Figure 3.37 : Détermination statistique de la moyenne d'IC₅₀

(moyenne \pm écart type)

Les antioxydants présentent un fort pouvoir antiradicalaire enregistré sur est l'extrait méthanolique en période de végétation avec une valeur d'IC₅₀ de $0,35 \pm 0,00$ mg/ml, par rapport à l'extrait méthanolique en période de floraison où nous enregistrons $0,43 \pm 0,02$ mg/ml (Figure 3.38).

Cette différence, est due à la richesse de l'extrait méthanolique en période de végétation, en composés phénoliques (acides phénols, flavonoïdes, tanins....) caractérisé par l'analyse d'HPLC. La présence des acides phénols, dérivés d'acide hydroxycinnamique (l'acide coumarique, acide chlorogénique et l'acide tannique) trouvé dans *Marrubium vulgare* est considérée comme élément clé pour l'efficacité antioxydante (Bourgou et al [48]). L'analyse d'HPLC révèle d'autres composés phénoliques non identifiés avec des proportions plus élevées que les acides phénoliques identifiés, la présence des flavonoïdes et

l'absence de l'acide tannique dans l'extrait méthanolique en période de floraison.

En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnues comme des substances potentiellement antioxydante ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires [126].

Plusieurs études ont révélées que la présence des composés phénoliques dans les plantes est associée à leurs activités antioxydantes, cela est probablement due à leurs propriétés réductrices qui les rendent comme agents réducteurs ou des donneurs d'hydrogène [127] , [128].

De même, la structure moléculaire et les différences dans le nombre et la position du groupe hydroxyle sur le cycle aromatique influencent l'activité antioxydante [129].

Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, car la synergie entre les différents produits chimiques doit être prise en considération dans l'activité biologique [48].

Le pouvoir antioxydant peut être expliqué par la présence d'un nouveau composé, la rutine au niveau de l'extrait méthanolique en période de végétation avec une proportion plus élevée que l'extrait méthanolique en période de floraison. Les résultats d'IC₅₀ de la rutine montrent une activité antioxydante plus élevée avec (0,007mg/ml). Elle est plus importante que l' α tocophérol avec (0,022mg/ml) et la quercétine avec (0,062mg/ml) respectivement (Figure 3.38).

Les analyses statistiques (ANOVA), confirme qu'il ya une différence très hautement significative entre les trois standards avec $p=0,00000$ (Appendice C).

Les activités antioxydantes des différentes substances étudiées s'enchaînent selon l'ordre décroissant suivant : rutine > α -tocophérol > quercétine > EMOHv > EMOHf.

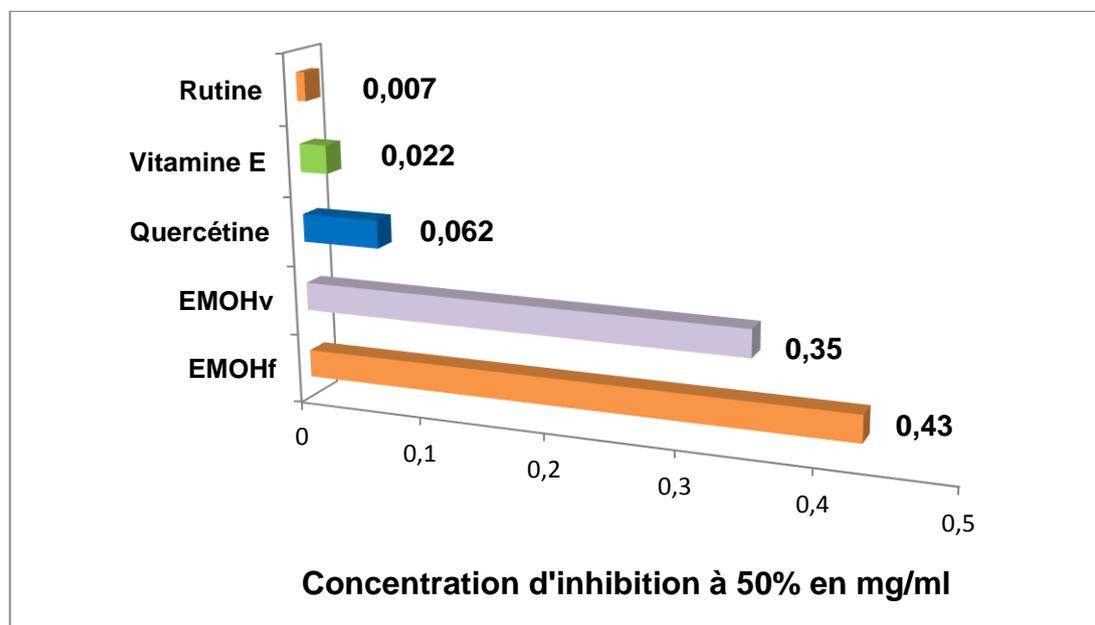


Figure 3.38 : IC₅₀ des extraits et les standards

Nos résultats indiquent que l'extrait méthanolique en période de floraison présente une activité remarquable vis-à-vis du piégeage du DPPH avec une IC₅₀ de 0,43 mg/ml. Ceci est en parfaite concordance avec les résultats de Boutlelis, [18] (échantillon provenant de El Taref en 2009) avec une valeur de IC₅₀ de l'ordre de 0,45mg/ml. Les travaux de Boudjelal, [24] (échantillon provenant de M'Sila en 2009), obtenus à partir de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* montre une faible activité antioxydante avec une valeur d'IC₅₀ l'ordre de 0,49 mg/ml.

A l'opposé, les travaux de Ghedadba, [26] (échantillon provenant de Batna en en 2011) sur l'extrait méthanolique de la partie aérienne (feuilles et sommités fleuries) de *Marrubium vulgare* a montré un puissant pouvoir antioxydant avec une IC₅₀ égal à 1,5 μ g/ml. Un puissant effet antioxydant

estimé d'un IC_{50} de 0,18 mg/ml de l'extrait brut méthanolique de la partie aérienne d'une autre espèce de *Marrubium* (*Marrubium peregrinum*) a été retrouvé à partir du piégeage du DPPH lors des travaux réalisés par Milan, [123] (échantillon provenant de Serbia en 2009).

Les travaux de Matkowski, [29] (échantillon provenant de Pologne) a montré une forte activité antioxydante de l'extrait méthanolique, l'extrait aqueux et l'extrait butanolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare*, avec une IC_{50} respectivement de 36,69 μ g/ml, 11,67 μ g/ml et 23,22 μ g/ml. Dans d'autres études entreprises par, Ghazghazi et *al.*, [130] et Aouadia et *al.*, [113] (échantillons provenant de Tunisie) sur le piégeage du DPPH par l'extrait méthanolique des feuilles de *Marrubium vulgare* ont enregistré un pouvoir antioxydant puissant avec des valeurs respectivement d' IC_{50} variant de 25 μ g/ml et 35 μ g/ml.

Ces métabolites secondaires ont un rôle antioxydant protecteur pour les végétaux contre les agressions de l'environnement (température, lumière) ou de pathogènes [118].

3.4. Activité antimicrobienne

Face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des produits naturels des extraits des plantes.

Lors de cette étude, nous avons testé l'action des extraits méthanoliques durant les deux périodes (Végétation/Floraison) du cycle de la plante vis-à-vis de quelques souches bactériennes et une souche fongique.

3.4.1. Activité antimicrobienne testée par la méthode de diffusion

La méthode de diffusion en milieu gélosé utilisée par Celiktas et *al.*, [106] est une méthode simple où les résultats sont satisfaisants. Il est difficile

d'utiliser cette méthode avec des quantités importantes d'échantillons car le disque est petit et le papier filtre utilisé ne permet pas d'imprégner une grande quantité de l'extrait. Ce test n'est qu'un criblage des activités antimicrobiennes des extraits, il nous permet de sélectionner pour chaque souche l'extrait qui a présenté le plus d'activité antimicrobienne.

Les activités antibactériennes et antifongiques des extraits et l'antibiotique, antifongique sont estimées par le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques, exprimée en mm (Tableau 3.11).

Tableau 3.11: Activité antimicrobiennes

Extraits Souches	EMOHv	EMOHf	Chloram- phénicol	Ampho- téricine B	DMSO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6537	0,00±0,00	10,6±0,29	22,55±0,20	-	0,00±0,00
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	0,00 ±0,00	11,32±0,55	28,55±0,30	-	0,00±0,00
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC533	12,24±1,44	0,00±0,00	32,04±0,68	-	0,00±0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC2035	10,16±0,28	10,64±0,80	22,78±0,36	-	0,00±0,00
<i>Basillus subtilis</i> ATCC9372	0,00±0,00	0,00±0,00	31,82±0,42	-	0,00±0,00
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	0,00±0,00	0,00±0,00	26,23± 0,06	-	0,00±0,00
<i>Klebsiela pneumoniae</i> ATCC4352	0,00±0,00	0,00±0,00	34,12 ± 0,47	-	0,00±0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,00±0,00	10,23±0,64	13,99±0,75	-	0,00±0,00
<i>Candida albican</i> ATCC10231	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,00±0,0	0,00±0,00

Les valeurs représentent la moyenne ± écart type (n=3)

Le pouvoir antibactérien est plus ou moins important selon la nature de la souche et le milieu de culture utilisé. Les tests montrent une grande hétérogénéité dans les résultats.

Le DMSO sans extrait a été utilisé en tant que contrôle négatif et n'a montré aucun effet inhibiteur sur la croissance microbienne. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.11.

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et de comparer leur pouvoir inhibiteur par rapport à celui des extraits étudiés. Nous avons testé l'activité d'un seul antibiotique par la même méthode de diffusion sur gélose. La mesure des zones d'inhibitions nous montre que toutes les souches bactériennes Gram (-) ou (+) sont très sensibles vis-à-vis à la chloramphénicol, avec une zone d'inhibition variant entre 13mm et 34mm, cette sensibilité est due au fait que cet antibiotique a un large spectre d'action, agissent sur les Gram (+) et les Gram (-), il inhibe la synthèse des protéines en stoppant l'activité de peptidyl transférase du ribosome bactérienne [131], [132] (Tableau 3.11).

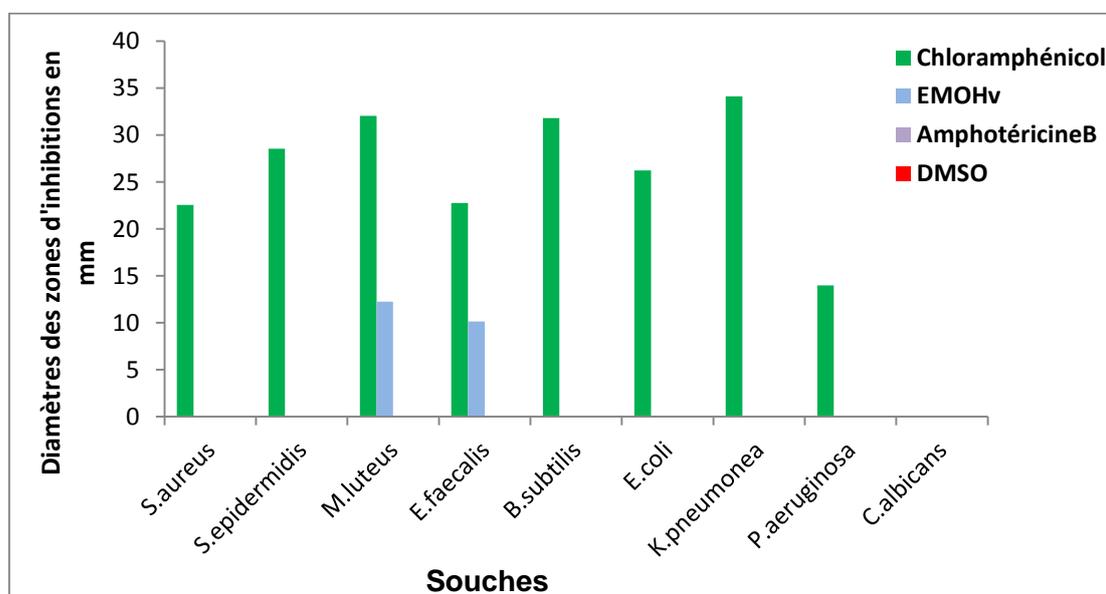


Figure 3.39 : Activité antimicrobienne des souches utilisées vis-à-vis EMOHv.

Parmi les huit souches testées montrent, il y a deux bactéries à Gram (+) qui sont sensibles à l'extrait méthanolique en période de végétation, c'est le cas de *M.luteus* avec une zone d'inhibition de $12,24\pm 1,44\text{mm}$ suivi par *E.faecalis* avec $10,16\pm 0,28\text{mm}$ (Figure 3.39) (Figure 3.40)



Figure 3.40 : Zone d'inhibition de *Entérocooccus faecalis* et *Micrococcus luteus*

Concernant les autres bactéries à Gram (+), *S.aureus* et *S.epidermidis* ont montré une résistance à l'extrait méthanolique en période de végétation.

Les autres bactéries à Gram (-) sont très résistantes à l'extrait méthanolique en période de végétation.

L'antibiotique le chloramphénicol s'est avéré très actif contre l'ensemble des souches bactériennes testées.

Un seul champignon testé, *Candida albicans* s'est révélé résistant à l'antifongique amphotéricine B et à l'extrait méthanolique en période de végétation. Aucune zone d'inhibition n'a été constatée autour des disques imprégnés d'une solution antifongique et l'extrait testé.

Vue l'absence des travaux sur le marrube blanc en période de végétation nous n'avons pas pu faire une comparaison.

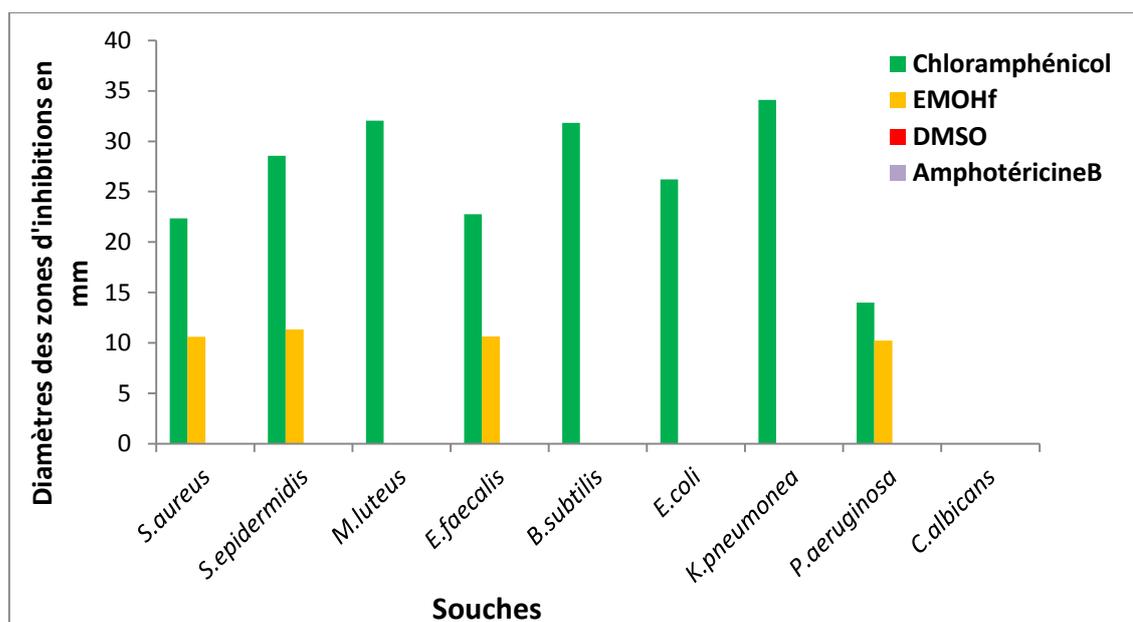


Figure 3.41 : Activité antimicrobienne des souches utilisées vis-à-vis EMOHf.

Les résultats de l'extrait méthanolique en période de floraison a donné une activité antibactérienne contre quatre bactéries (Figure 3.41), la plus part sont à Gram (+), avec des zones d'inhibitions variant entre 10 et 11mm, *S.aureus* $10,6 \pm 0,29$ mm, *S.epidermidis* $11,32 \pm 0,55$ mm et *E.faecalis* $10,64 \pm 0,80$ mm, (Figure 3.42). Contrairement pour les bactéries à Gram (-), une seule bactérie *P. aeruginosa* s'est révélée sensible à l'extrait méthanolique avec une zone d'inhibition de $10,23 \pm 0,64$ mm.

Les autres bactéries testées sont extrêmement résistantes à l'extrait méthanolique. La comparaison des résultats obtenus avec le chloramphénicol montre que ce dernier est très efficace contre toutes les souches bactériennes testées.

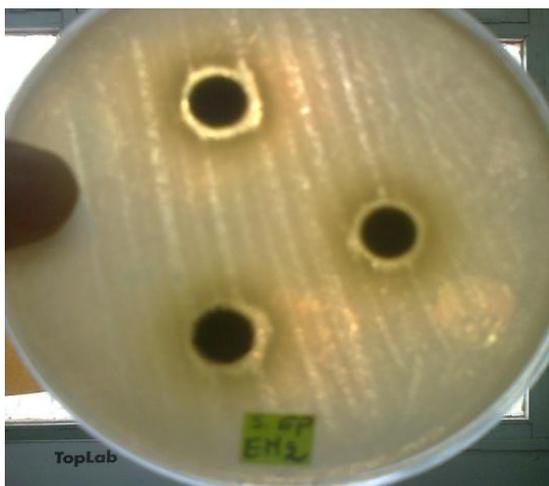


Figure 3.42 : Zone d'inhibition de *S.epidermidis*

L'extrait méthanolique en période de floraison est inactif contre *C.albicans*, aucune zone d'inhibition n'est révélée autour des disques imprégnés d'une solution antifongique l'amphotéricine B et l'extrait méthanolique testé.

Boudjelal, [24], a montré que l'extrait méthanolique des feuilles en période de floraison est efficace sur *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli* et *C.albicans*. Dans notre cas, l'extrait methanolique est actif sur *S.aureus*, *P.aeruginosa* et inactif sur *E.coli* et *C.albicans*.

Ghedadba et *al.*, [26], ont signalé que l'extrait méthanolique des feuilles et les sommités fleuries n'exercent aucun effet sur *S.aureus*, *E.coli* et *P.aeruginosa*. Selon Boutelis et *al.*, [111], l'effet antibactérien est important avec l'extrait tannique vis-à-vis des souches considérées parmi les plus résistantes aux antibiotiques telle que *P.aeruginosa*, *S.aureus*.

Le travail de recherche de Boutelis, [18], signale que l'extrait flavonoïque des feuilles de *Marrubium vulgare* en période de floraison sur *P.aeruginosa*, *E.coli* et *S.aureus* a un effet positif.

L'extrait hexanique et l'extrait méthanolique (hydroalcoolique) induisent une forte sensibilité sur *Bacillus cereus* et *S. aureus* et à un degré moindre sur *E. coli* (Bouterfas et al [118]).

L'extrait ethanolique des feuilles de *Marrubium vulgare* a montré un effet antibactérien très puissant sur *K. pneumoniae* selon Dehbashi et al., [133]. Le même test que nous avons réalisé sur *K.pneumonea* a révélé un effet négatif.

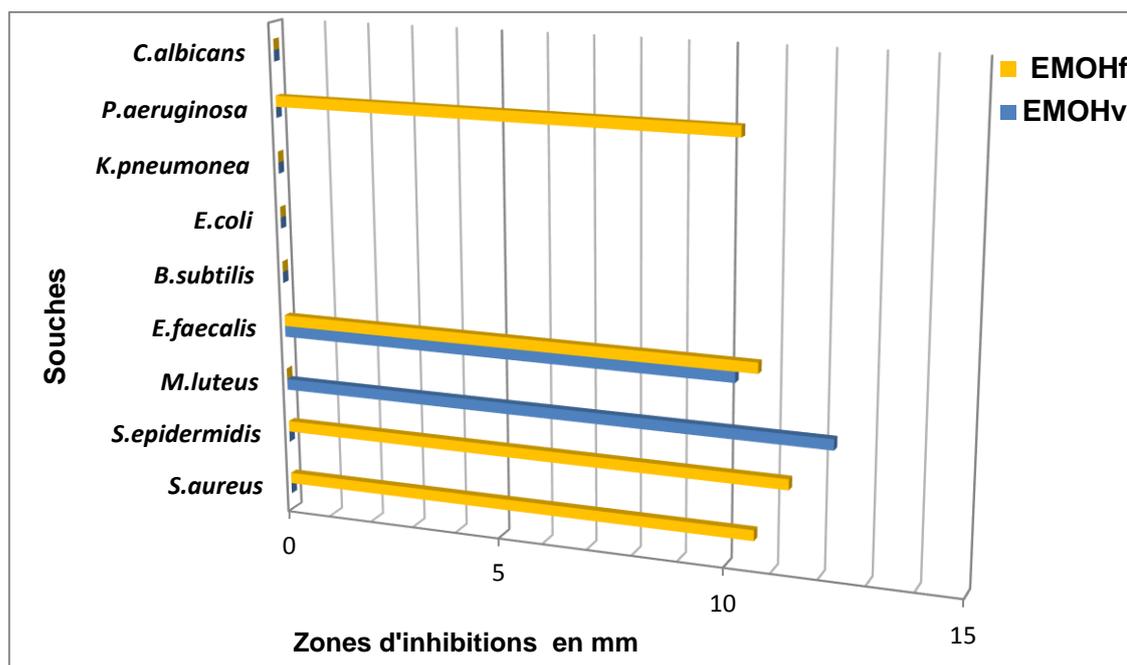


Figure 3.43 : Comparaison de l'activité antimicrobienne de deux extraits méthanoliques.

Les deux extraits méthanoliques montrent un effet antibactérien plus remarquable vis-à-vis les Gram (+) par rapport Gram (-), notons que la bactérie *E.faecalis* est sensible à l'extrait méthanolique des feuilles durant le cycle végétatif et reproducteur de la plante (Figure 3.43).

Par ailleurs, les staphylocoques ont montré une sensibilité à l'extrait méthanolique en période de floraison et une résistance à l'extrait méthanolique en période de végétation.

M.luteus a enregistré une zone d'inhibition plus grande que les autres souches, elle est sensible à l'extrait méthanolique en période de végétation, et se comporte différemment en période de floraison avec une plus grande résistance.

La seule souche *P. aeruginosa* des Gram (-) testée est sensible à l'extrait méthanolique en période de floraison. Les autres souches bactériennes possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action des extraits et ce quelque soit la période.

L'extrait méthanolique en période de floraison s'est montré actif contre la moitié des microorganismes par rapport à l'extrait méthanolique en période de végétation.

Cette différence peut s'expliquer par le fait que *Marrubium vulgare* en période de floraison présente un taux plus élevé en composés phénoliques (192,67mgEAG /g MS) que l'extrait méthanolique en période de végétation (168, 60 mg EAG/g MS).

Cette action antimicrobienne est confirmée par le fait que la plante produit différents métabolites secondaires appartenant à certaines classes connues pour avoir ce type d'activité tel : les composés phénoliques [3]. Les alcaloïdes sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes [134] [135].

En effet, les résultats d'HPLC, montre que les deux extraits (végétation/floraison) contiennent une quantité appréciable en composés phénoliques identifiés en association avec d'autres composés non identifiés.

Plusieurs travaux mettent en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux bactéries Gram (-) [118], [136], [24]. Cela peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) par rapport aux bactéries Gram (+). En effet, les bactéries Gram (-) possèdent une couche additionnelle à la membrane externe, composée de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides, formant une barrière imperméable et joue un rôle protecteur.

Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que l'activité antibactérienne est en relation avec la période de récolte, la nature du solvant et le type des microorganismes ciblés, la concentration, le type d'extrait et particulièrement la nature et la structure moléculaire des molécules bioactives des métabolismes secondaires. Nous pouvons déduire que le méthanol (solvant le plus polaire) est capable d'extraire le maximum des principes actifs appartenant à diverses classes de métabolites [26].

Conclusion

L'étude botanique (macroscopique et microscopique) a permis de distinguer la présence des poils tecteurs et des poils sécréteurs dans la partie aérienne de *Marrubium vulgare* pendant les deux périodes (végétation et floraison) de la présente étude.

L'étude phytochimique a révélé qu'il n'y a pas une différence du taux d'eau dans les feuilles de la plante étudiée et la période de récolte, il est de 51,57% durant la période de végétation et 51,76% durant la période de floraison.

Le taux d'humidité après séchage des feuilles est de 9% en période de végétation et 10% en période de floraison.

Nous avons noté une diminution du taux de cendres dans les feuilles durant la période de végétation en comparaison à la période de floraison avec respectivement 16,18% et 13,50%.

La caractérisation de quelques métabolites secondaires de la poudre végétale a montré la présence durant les deux périodes de flavonoïdes, tanins, saponines, alcaloïdes, coumarines, terpènes et stérols.

L'utilisation de procédé d'extraction par Soxhlet a permis d'obtenir un très bon rendement de l'extrait méthanolique en période de floraison avec 27,46% comparé à la période de végétation avec 17,1%.

L'analyse par CCM a révélé la présence de quercétine et la rutine pendant la période de végétation. Au moment de la floraison nous avons détecté uniquement la présence de la quercétine.

Les profils HPLC des différents chromatogrammes ont mis en évidence la présence de nombreux métabolites secondaires avec des temps de rétention très variables durant les deux périodes.

L'HPLC a permis d'identifier la composition chimique de la plante, à savoir les acides phénoliques, les flavonoïdes, tanins et d'autres composés non identifiés. Pour la première fois, nous avons identifié la rutine ; indiquant la richesse de la plante par ces métabolites secondaires qui ont de grandes valeurs thérapeutiques.

Certains composés actifs ont été dosés séparément et ceci nous a permis d'en déduire qu'en passant de la période de végétation à la période de floraison il y'a une augmentation importante de la quantité de composés phénoliques, flavonoïdes et des tanins condensés.

L'étude de l'activité anti-radicalaire par la méthode de DPPH montre que l'extrait méthanolique en période de végétation a une activité antioxydante meilleure que celle provoquée par l'extrait méthanolique en période de floraison, dont les IC_{50} sont respectivement 0,35mg /ml et 0,42mg/ml.

L'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques a montré une inhibition variable vis-à-vis des souches à Gram (+) avec un pouvoir antimicrobien remarquable contre *M. luteus* et *E. faecalis* de l'extrait méthanolique en période de végétation et *S.aureus*, *S. epidermidis* et *E. faecalis* en période de floraison. L'extrait méthanolique en période de végétation a donné un effet négatif sur les bactéries à Gram (-), mais l'extrait méthanolique en période de floraison a donné un effet négatif sur la totalité des souches sauf pour la bactérie *P.earuginosa*.

Pour l'activité antifongique, l'extrait méthanolique durant le cycle végétatif et reproducteur de la plante n'a eu aucun effet vis-à-vis du champignon *Candida albicans*.

A l'issu de ce travail, nous pouvons dire que le *M. vulgare*, est une plante très intéressante du point de vue thérapeutique.

En perspective, l'isolement des molécules bioactives responsables des effets thérapeutiques est nécessaire par l'utilisation de techniques plus performantes. Ces dernières s'articulent autour de l'HPLCL/MS et la RMN qui restent indispensables, afin de déterminer la structure moléculaire des principes actifs pour mieux comprendre leur mode d'action.

Aussi, serait-il souhaitable, pour une meilleure compréhension du mode d'action des composés phénoliques, d'évaluer in vitro et in vivo l'activité antioxydante de chacun de ces composés pris séparément. Ce qui permettrait alors de mettre en évidence le principe actif des extraits de plante et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés phénoliques.

Suivre la variation des composés phénoliques régulièrement durant le cycle végétatif et reproducteur de la plante.

Il est intéressant d'évaluer d'autres tests, inflammatoire, toxicité, cicatrisante pour mieux valoriser cette espèce le *Marrubium vulgare*.

APPENDICE A

Tableau 1 : Activités biologiques et compositions chimiques du genre

Marrubium [146].

Espèces	Activités Biologiques	Composées
<i>M. alysson L.</i>	Antibactérienne	Steroides, flavonoïdes, glycoside flavonoïdes, diterpenes, acides triterpénique et phénylpropanoïdes
<i>M. alternidens</i>	spasmolytique, hypotensive, cholagogue, et agents sédatives	Tannins, flavonoïdes, phénols, alcaloïdes, coumarines et saponines
<i>M. astracanicum Jacq.</i>	-	Diterpènes
<i>M. catariifolium</i>	-	Diterpènes
<i>M. cordatum</i>	antioxydante	-
<i>M. cuneatum</i>	Antibactérien	Huile essentiel
<i>M. cylleneum</i>	tyrosinase inhibitory activity, cytotoxic	Diterpènes Flavonoïdes glycosidique, flavonoïdes, poly phénols, alcaloïdes
<i>M. deserti</i>	respiratory diseases, fever, diabetes, jaundice and hypertension, antioxidant activity	-
<i>M. frivaldskyanum Boiss</i>	-	Prefuranic labdane diterpene
<i>M. globosum ssp libanoti-cum</i>	Anti-inflammatoire, antispasmodique et antioxydante	Diterpenes et Flavonoïdes
<i>M. incantum</i>	Antimicrobienne	Acides tritèrpenique

<i>M. parviflorum subsp. oligodon</i>	-	Terpènes, Flavonoïdes, phytosterols, hydrocarbons
<i>M. peregrinum</i>	antilipoperoxidative in vitro activity	Flavone aglycones, flavone, glycosides, coumaroylated flavone glycosides, phenylethanoids, diterpenoids, composes phénoliques et stérols
<i>M. polyodon Boiss</i>	antimicrobial	Labdane diterpène, stérols, sesquiterpens, alcaloïdes et Flavonoïdes
<i>M. propinquum</i>	-	-
<i>M. radiatum Devile ex Benth</i>	angiotensin converting enzyme inhibition activity, antihyperglycemiant	-
<i>M. sericeum</i>	-	Diterpènes
<i>M. supinum</i>	-	Diterpènes
<i>M. thessalum Boiss. et Heldr</i>	-	Diterpènes, Acids triterpenes
<i>M. trachyticum</i>	-	Diterpenes et Flavonoïdes
<i>M. velutinum Sibth. et Sm.</i>	cytotoxicity	Flavonoïdes, diterpènes, phenylethanoides glycosides, lignines, glycosides, acide phénolique et alcaloïde
<i>M. vulgare</i>	expectorant, stimulant digestive, anti-inflammatoire, antiasthmatique, antihypertensive, hypolipidémiant, antibactérienne, antifongique, analgésique, antiedematogenic,	Diterpènes, stérols, flavonoïdes, phenylpropanoid esters, tannins, phénols, alcaloïdes, coumarines et saponines

✚ **Habitat du *Marrubium vulgare***



Figure1 : Habitat de *Marrubium vulgare*

Les flavonoïdes

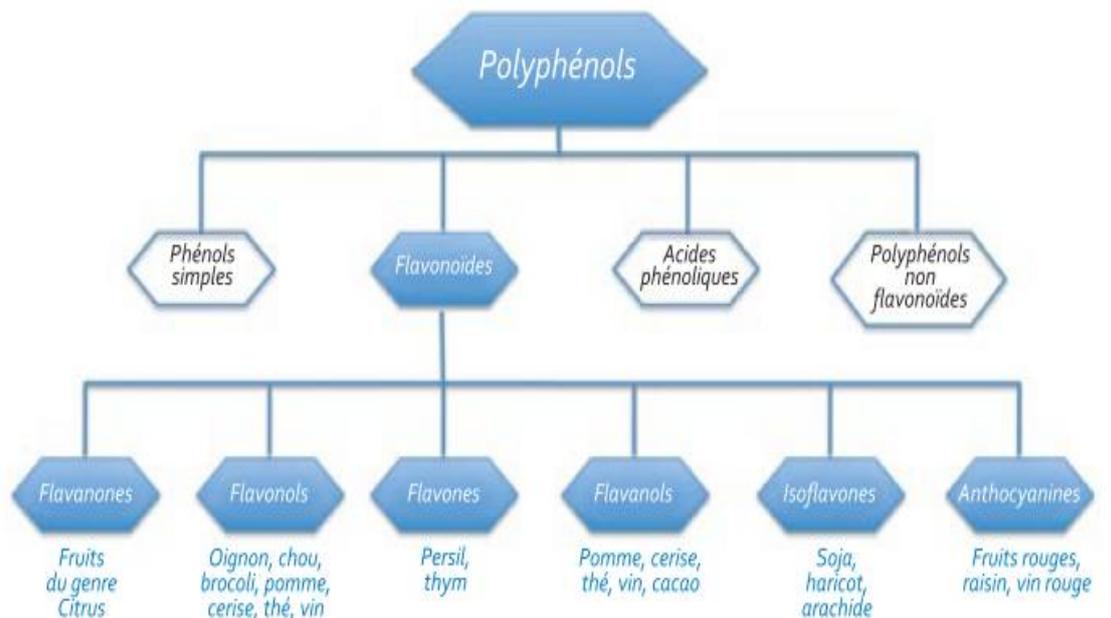


Figure 2 : Principales catégories de polyphénols et source alimentaire connus de principe flavonoïdes [139]

APPENDICE B

Matériaux utilisés

- Loupe binoculaire de type Leika200
- Microscope photonique de type Motic
- Four à moufle de marque Muve MF120
- Plaque chauffante
- Soxhlet
- Evaporateur rotatif de marque Quickfit RE100/R
- Etuve
- Appareil de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de type Agilent technologie1260 infinity
- Lampe UV
- Spectrophotomètre UV-1601, Shimadzu
- Chromatographie sur couche mince
- Pied à coulisse électronique (BERENT BT4171)
 - ✚ Nous avons utilisés aussi la petite verrerie ordinaire du laboratoire tel :
- Bêchers de 20ml, 40ml, 100ml et 500ml
- Pipettes graduées de 5ml et 10ml
- papier filtre
- Entonnoirs en verre
- Fioles (100ml et 500ml), fiole conique de 500ml et des erlenmyers (50ml, 100ml et 300ml)
- Tubes à essai

- Ballon
- Boites de Pétri
- Disque en papier filtre de 9mm
- Papiers absorbants (watman n° 3)

Réactifs nécessaires

- Eau de Javel à 12°
- Acide acétique
- Vert de méthyle
- Rouge Congo
- Acide chlorhydrique
- Eau déminéralisée
- Acide sulfurique
- Eau distillée
- Ether de pétrole
- Méthanol
- diéthyl ether
- Butanol
- Une solution de chlorure d'aluminium à 2% dans l'alcool à 95°.
- Une solution aqueuse de chlorure ferrique aqueux à 1%.
- Une solution de potasse alcoolique à 5%.
- Réactif de Dragendorff



Figure 1 : Pied à coulisse électronique

- Caractérisation des saponines



Figure2 : Caractérisation des saponines

APPENDICE C

Tableau1 : Teneur en eau en période de végétation

Période de végétation	Poids frais (en g)	Poids sec (en g)	Teneur en eau %
1essai	1,00	0,5211	47,89
2essai	1,00	0,4767	52,33
3essai	1,00	0,4551	54,49
Moyenne	1,00	0,4843	51,57
Ecart type	±0,00	±0,0008	±0,03

Tableau 2: Teneur en eau en période de floraison

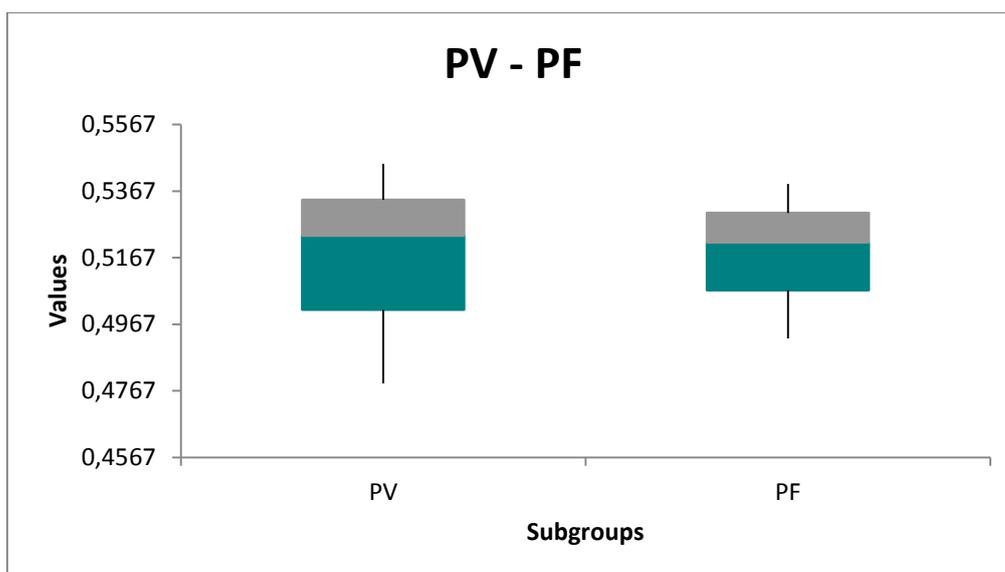
Période de Floraison	Poids frais (en g)	Poids sec (en g)	Teneur en eau %
1essai	1,0084	0,4649	53,89
ss2essai	1,0017	0,4795	52,13
3essai	1,0067	0,5109	49,25
Moyenne	1,0056	0,4851	51,76
Ecart type	±0,0028	±0,0042	±0,02

Etude statistique de la teneur en eau

Anova: Single Factor α 0,05

ANOVA Cannot Reject Null Hypothesis because $p > 0,05$ (Means are the same)

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-Value	F crit
Between Groups	5,2267E-06	1	5,2267E-06	0,00621847	0,941	7,70864742
Within Groups	0,00336203	4	0,00084051			
Total	0,00336725	5				



Teneur en cendres

Tableau 3 : Teneur en cendres en période de végétation

Période de végétation	Poids avant calcination (en g)	Poids après calcination (en g)	Tare	Masse de cendres	Masse de poudre	% de cendres
1essai	38,1752	36,4696	36,1356	0,334	2,0396	16,37
2essai	41,3982	39,6814	39,3545	0,3269	2,0437	15,99
3essai	40,6801	38,9653	38,6341	0,3312	2,0460	16,18
Moyenne	40,0845	38,3721	38,0414	0,3307	2,0431	16,18
Ecart type	±1,6920	±1,6860	±1,6893	±0,0035	±0,0032	±0,0019

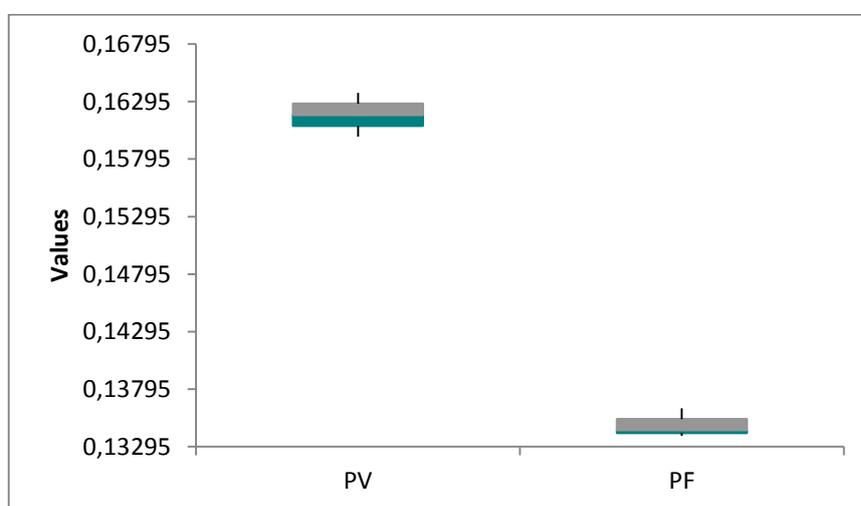
Tableau 4 : Teneur en cendres en période de floraison

Période de floraison	Poids avant calcination (en g)	Poids après calcination (en g)	Tare	Masse de cendres	Masse de poudres	% de cendres
1essai	34,4606	32,6899	32,4148	0,2751	2,0458	13,44
2essai	34,6682	32,9110	32,6378	0,2732	2,0304	13,39
3essai	42,0165	40,2545	39,9764	0,2781	2,0401	13,63
Moyenne	37,0484	35,2851	35,0096	0,2754	2,0387	13,48
Ecart type	±4,3037	±4,3050	±4,3027	±0,0024	±0,0077	±0,1266

Etude statistique de la teneur en cendres

ANOVA Reject Null Hypothesis because $p < 0,05$ (Means are Different)

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-Value	F crit
Between Groups	0,00108811	1	0,00108811	417,432225	0,000	7,70864742
Within Groups	1,0427E-05	4	2,6067E-06			
Total	0,00109853	5				



Résultats du taux de cendres

✚ Résultats de la destruction de la matière organique par calcination

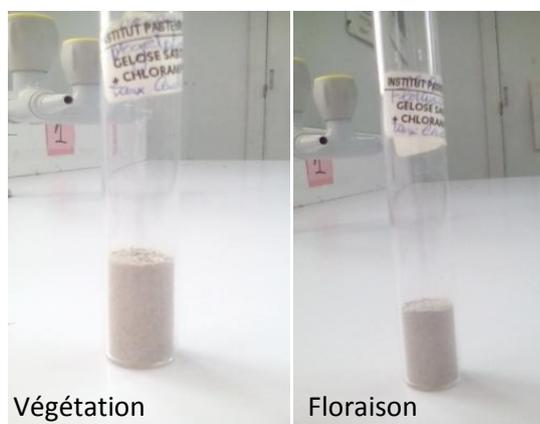


Figure 5 : Cendres blanchâtres durant la période de végétation et floraison

Analyses de l'extrait méthanolique par HPLC

Tableau 3.8 : Temps de rétention pour les étalons

N°	Étalons	Temps de rétention en mn
01	Acide salicylique	13,6
02	Acide coumarique	14,5
03	Acide gallique	2,5
04	Acide ascorbique	0,93
05	Acide caféique	2,81
06	Acide chlorogénique	8,14
07	Acide tannique	2,7
08	Catéchine	7,3
09	Quercétine	13,04
10	Rutine	9,48
11	Vanilline	10,33

Dosage des composés phénoliques totaux

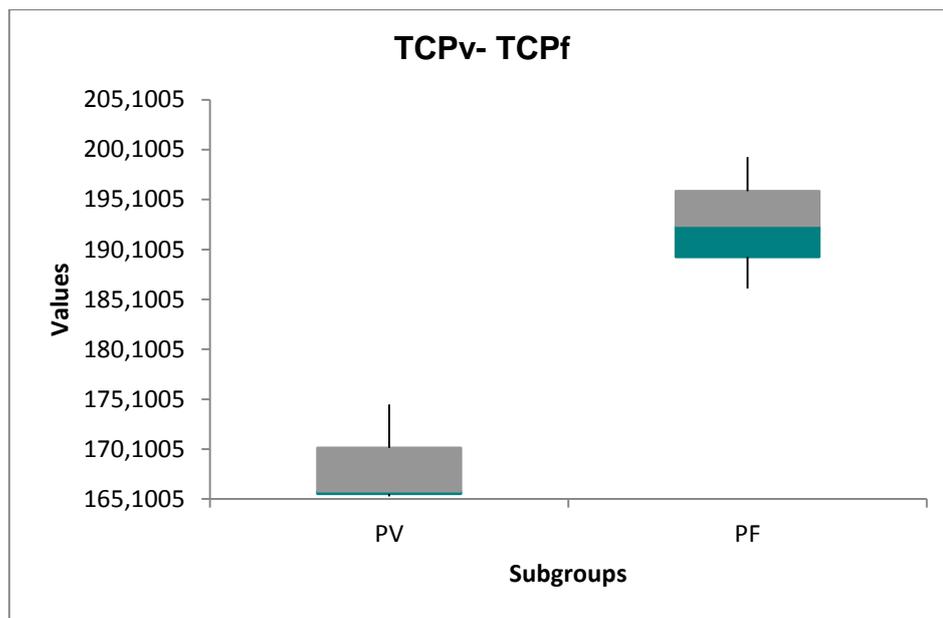
Etude statistique

Anova: Single Factor α 0,05

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
TCPv	3	505,818	168,606	26,930961	
TCPf	3	578,034	192,678	43,459807	

ANOVA Reject Null Hypothesis because $p < 0,05$ (Means are Different)

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-Value	F crit
Between Groups	869,191776	1	869,191776	24,6961867	0,008	7,70864742
Within Groups	140,781536	4	35,195384			
Total	1009,97331	5				



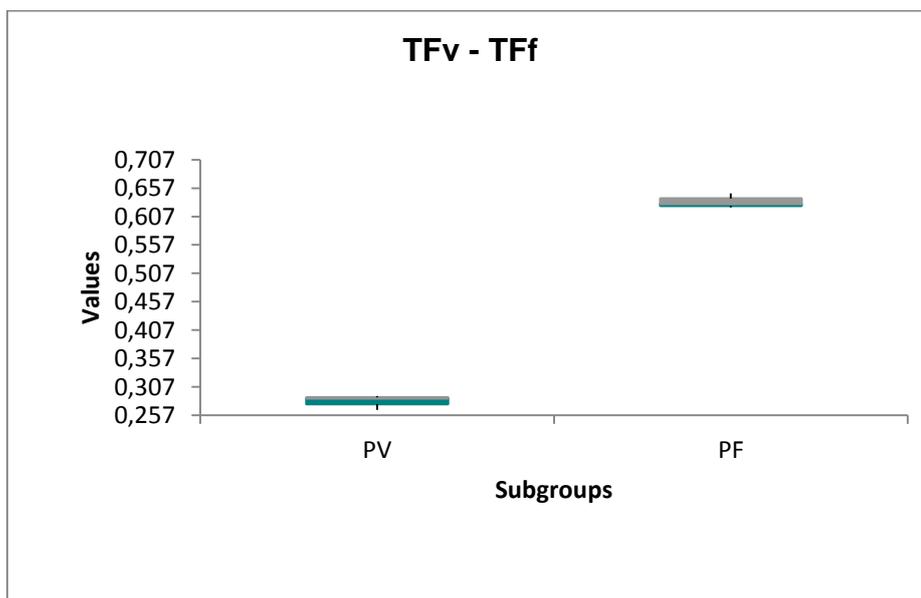
Dosage des flavonoïdes

Anova: Single Factor α 0,05

SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
TFv	3	0,8447	0,28156667	0,00016256
TFf	3	1,9	0,63333333	0,00017033

ANOVA Reject Null Hypothesis because $p < 0,05$ (Means are Different)

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-Value	F crit
Between Groups	0,18560968	1	0,18560968	1115,1189	0,000	7,70864742
Within Groups	0,00066579	4	0,00016645			
Total	0,18627548	5				



Dosage des tanins condensés

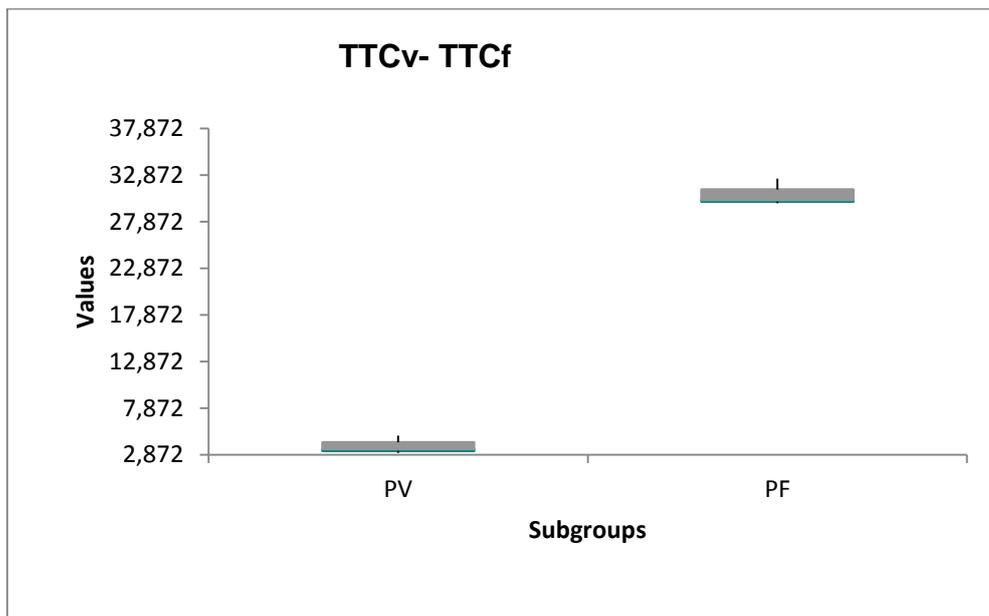
Anova: Single Factor α 0,05

SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
TTCv	3	11,478	3,826	0,923728
TTCf	3	92,595	30,865	2,064153

ANOVA

Reject Null Hypothesis because $p < 0,05$ (Means are Different)

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-Value	F crit
Between Groups	1096,66128	1	1096,66128	734,072931	0,000	7,70864742
Within Groups	5,975762	4	1,4939405			
Total	1102,63704	5				



Activité Antioxydante

Tableau 5 : Pourcentage d'inhibition de l'EMOHv et EMOHf

Concentration de l'EMOHv et l'EMOHf	% Inhibition du DPPH l'EMOHv	Ecart type	%Inhibition du DPPH l'EMOHf	Ecart type
0	0,00	±0,00%	0,00	±0,00%
0,2	27,83	±0,27%	33,84	±2,04%
0,4	56,15	±1,01%	47,23	±2,01%
0,6	80,23	±0,51%	62,37	±1,55%
0,8	84,9	±0,14%	75,76	±0,90%
1	86,1	±0,02%	81,09	±0,56%

Tableau.6 : Pourcentage d'inhibition de la rutine et quercétine

Concentration de la rutine En mg/ml	% Inhibition du DPPH	Ecart type	Concentration de la quercétine En mg/ml	% Inhibition du DPPH	Ecart type
0	0,00	±0,00%	0,00	0,00	±0,00%
0,0025	17,33	±5,84%	0,05	38,94	±3,183%
0,005	36,91	±,983%	0,1	83,96	±5,30%0
0,01	70,71	±1,138%	0,2	88,91	±0,205%
0,03	89,13	±6,774%	0,3	89,29	±0,794%
0,03	93,76	±1,279%			
0,04	95,49	±0,473%			

Tableau.7 : Pourcentage d'inhibition de l'α tocophérol I

Concentration en mg/ml de α tocophérol	%Inhibition du DPPH	Ecart type
0	0,00	±0,00%
0,006	26,933	±0,256%
0,0125	30,5	±0,227%
0,025	55,57	±0,561%
0,05	93,90	±0,939%

Calcul d'IC₅₀ à partir des courbes d'étalonnages

 Quercétine

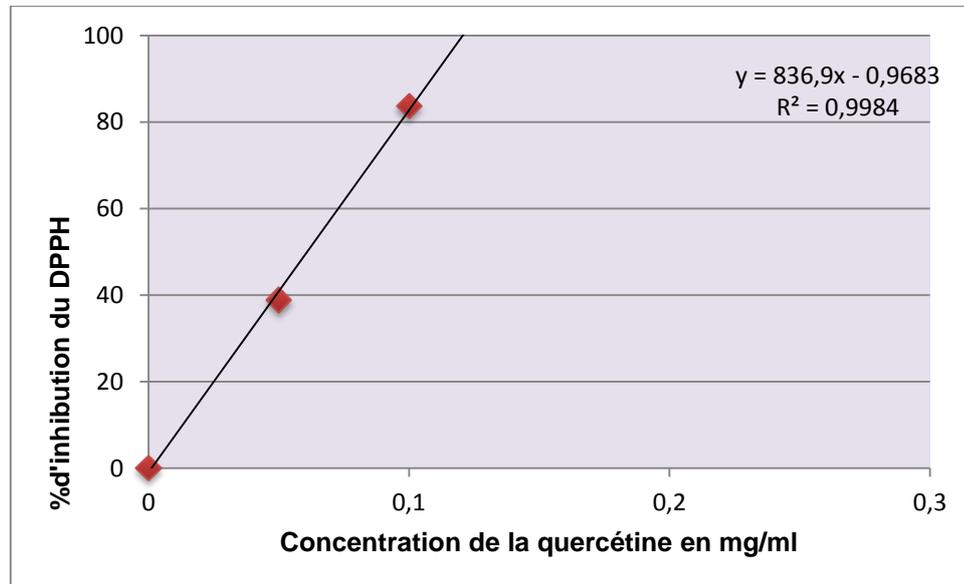


Figure 8: Courbe d'étalonnage de la quercétine

 α tocophérol

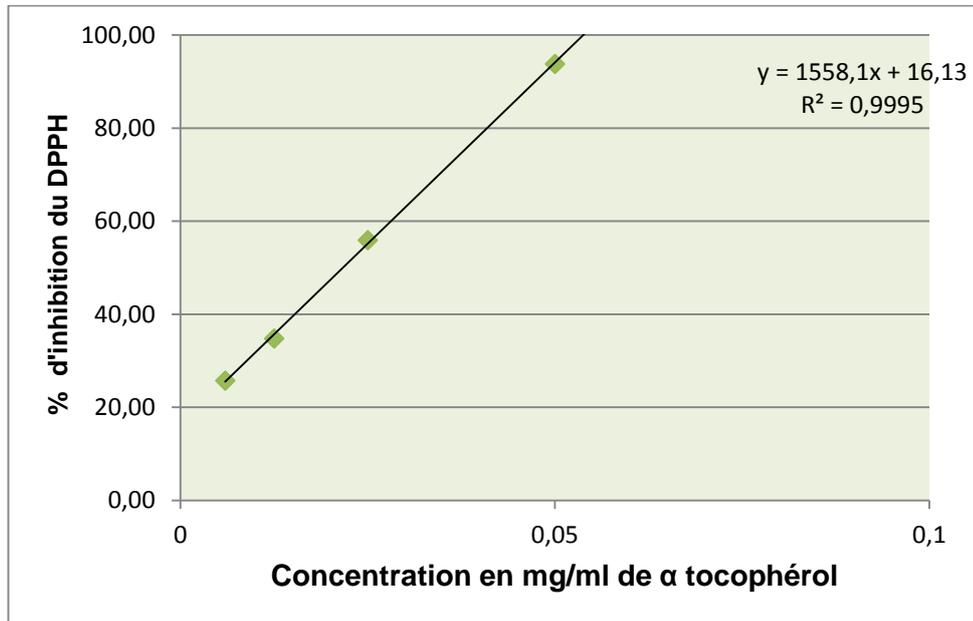


Figure 9 : Courbe d'étalonnage de l'α tocophérol

 Rutine

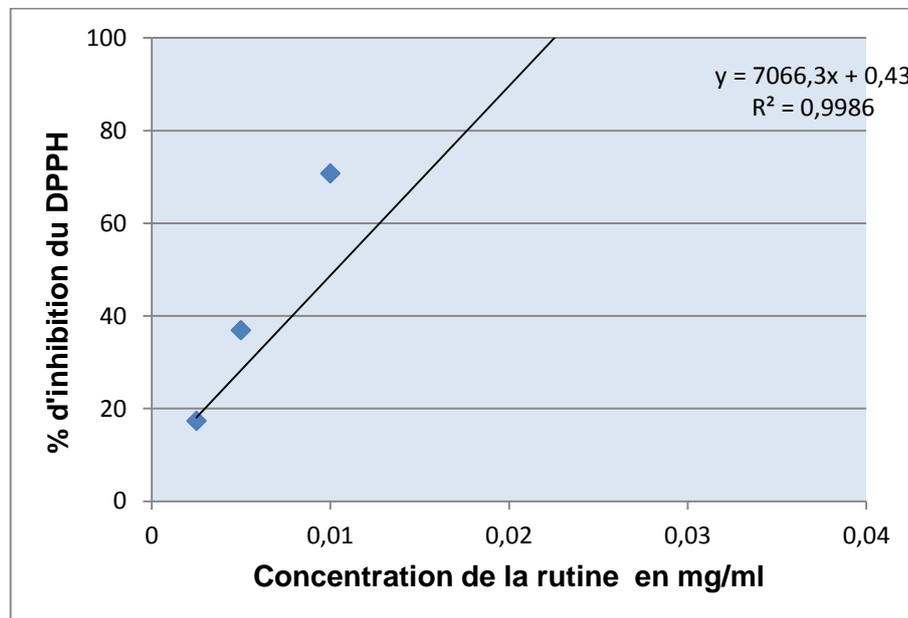


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la rutine

 EMOHv

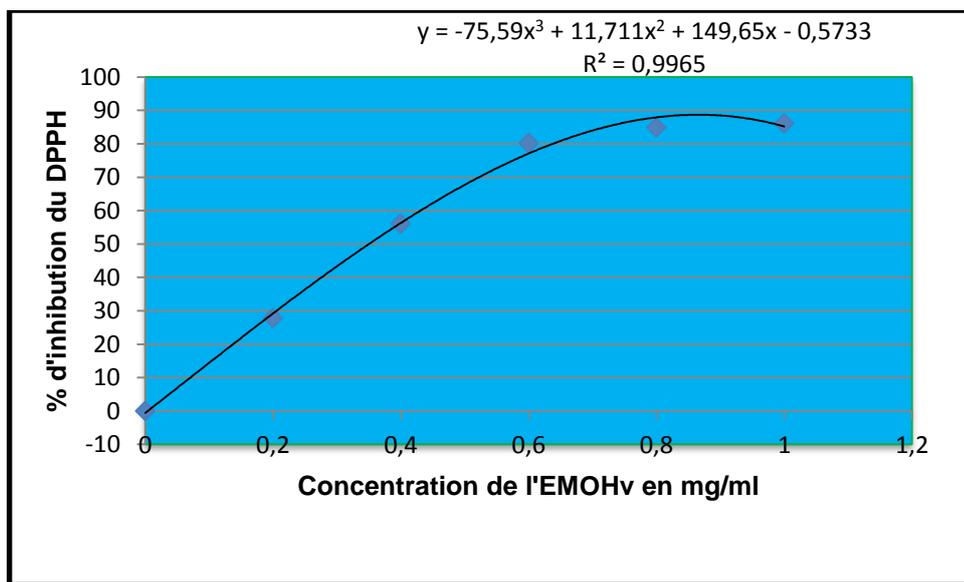


Figure 11 : Pourcentage d'inhibition à 50% de l'EMOHv

 EMOHf

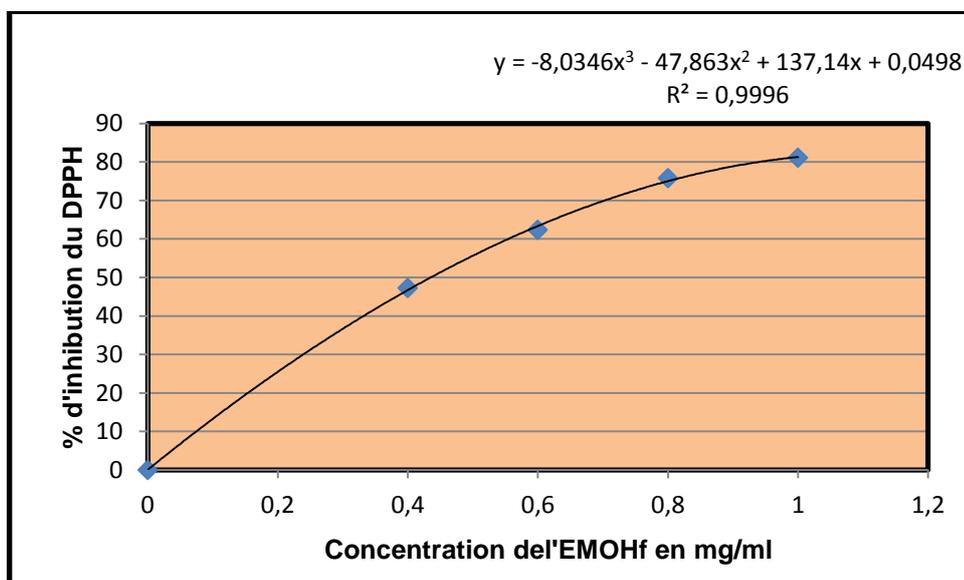


Figure 12 : Pourcentage d'inhibition à 50% de l'EMOHf

Résultats de l'ANOVA pour les standards(étalons) et les extrait

Anova: Single Factor α 0,05

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
IC50EMOHv	3	1,066	0,35533333	2,5333E-05	
IC50EMOHf	3	1,292	0,43066667	0,00067033	
IC50 Quercétine	3	0,187	0,06233333	5,3333E-06	
IC50 Vitamine E	3	0,066	0,022	1E-06	
IC50 Rutine	3	0,02085	0,00695	2,5E-09	

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-Value	F crit
Between Groups	0,48668428	4	0,12167107	866,599975	0,000	3,47804969
Within Groups	0,001404	10	0,0001404			
Total	0,48808828	14				

Test de Levene

Anova: Single Factor α 0,05

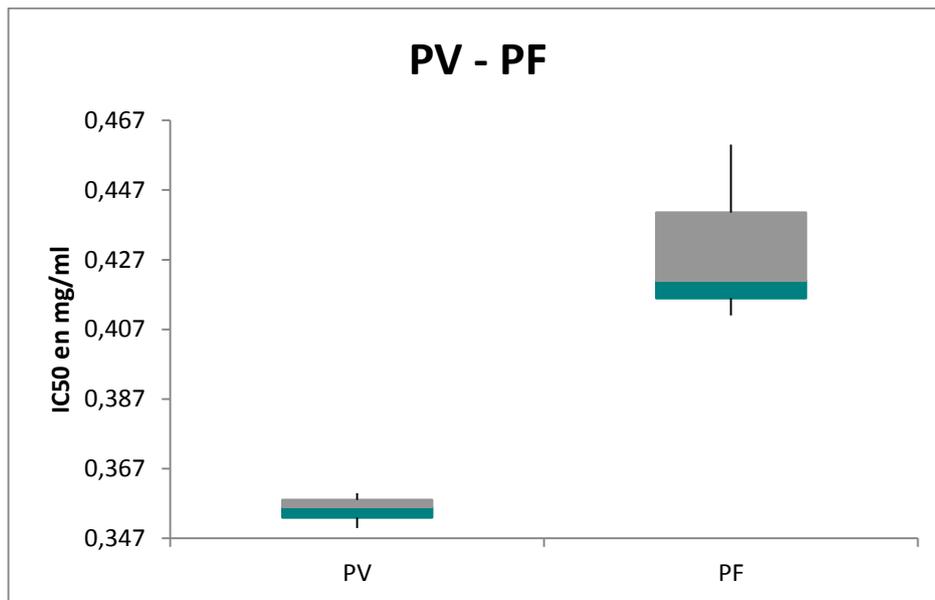
Levene's	
Test	1,639
<i>p</i>	0,239

α = 0,05

Comparaison entre le IC₅₀ de EMOHf et EMOHv

ANOVA

Source of Variation	SS	Df	MS	F	P-Value	F crit
Between Groups	0,00851267	1	0,00851267	24,4734068	0,008	7,70864742
Within Groups	0,00139133	4	0,00034783			
Total	0,009904	5				



APPENDICE D

GLOSSAIRE

a. Lexique Botanique

Aisselle : espace situé entre la base d'une feuille(ou d'un axe) et l'axe qui les porte.

Akène : fruit sec indéhiscent dérivant d'un carpelle unique et ne renfermant qu'une seule graine.

Androcée : Ensemble des étamines (partie mâle de la fleur).

Anthère : Partie de l'étamine portée par le filet, contenant le pollen dans les loges polliniques

Arborescent : qualifie une plante ayant la taille et le port d'un arbre.

Arbre : végétal ligneux (bois secondaire) caractérisé par son tronc, son houppier et sa longévité.

Arbrisseau : végétal ligneux caractérisé par sa taille inférieure à 4 m et son absence de tronc.

Arbuste : végétal ligneux de plus de 4 m et ayant par ailleurs les même caractéristiques qu'un arbrisseau.

Asymétrique : qualifie une fleur (ou un organe) sans axe ni plan de symétrie.

Bipare : qualifie une cyme dont les rameaux sont opposés deux par deux (inflorescence)

Bractée : petite feuille colorée, située à la base d'un pédoncule floral.

Calice: verticille externe du périanthe d'une fleur, c'est l'ensemble des sépales.

Corolle : ensemble des pétales d'une fleur.

Cotonneux : qualifie un organe recouvert de poils mous, courts et entremêlés.

Crénelé : qualifie un organe pourvu de dents obtuses et arrondies. (→ *feuille*)

Drogues végétales : Les plantes ou parties de plantes sont utilisées entières ou coupées, le plus souvent après avoir été séchées, plus rarement à l'état frais. Elles peuvent être absorbées telles quel ou sous formes de gélule

Étamine : Organe reproducteur mâle d'une fleur ; elle est composée d'une anthère habituellement à deux loges fixée à un filet.

Gamopétales : qualifie une corolle dans laquelle les pétales sont soudés entre eux.

Glomérule : inflorescence globuleuse formée de fleurs subsessiles.

Inflorescence : Ensemble de fleurs groupées sur un même axe.

Labié : qualifie un calice ou une corolle organisés en deux lèvres.

Laineux : recouvert de poils épidermiques très denses, longs et entremêlés.

Nervure : structure conductrice de sève située dans le limbe des feuilles.

Ovaire : Partie inférieure creuse et généralement renflée du gynécée, renfermant un ou plusieurs ovules.

Phloème : tissu vasculaire assurant la conduction de la sève élaborée dans la plante.

Poudres : sont obtenues par pulvérisation de la plante sèche.

Quadrangulaire : qui présente un section à quatre angles.

Rhizome : tige souterraine portant des racines adventives en général.

Stigmate : Partie supérieure du pistil qui réceptionne le pollen.

Sympétale : qualifie une corolle dans laquelle les pétales sont soudés entre eux.

Trichome : ensembles des poils d'une plante.

Verticille : ensemble d'organes de même nature insérés en cercle et à un même niveau.

Xylème : tissus conducteur lignifié assurant la conduction de la sève brute.

Zygomorphe : qualifie une fleur dont la symétrie passe par un plan et non par un axe.

b. Lexique Médical

Allergie : toute modification de l'organisme par une substance capable de se comporter comme un antigène.

Anaérobie : des microbes qui ne peuvent pas vivre au contact de l'air.

Analgésique : qui abolit la sensibilité à la douleur.

Analgésiques ou **antalgiques** : médicaments qui soulagent ou suppriment la douleur. Contrairement aux anesthésiques, ils agissent sans entraîner de perte des sensations ou de la conscience.

Anémie : Diminution notable du nombre des globules rouges (ou hématies) du sang.

Antalgique : Qui calme la douleur.

Antibiotiques : substance qui empêche le développement de certaines micro-organismes, et peut même les détruire.

Anticancéreux : médicaments cytotoxiques, toxiques pour les cellules, prescrits dans le but de détruire ou de stopper la croissance des cellules tumorales.

Antidépresseurs : médicaments utilisés pour traiter la dépression.

Antidiabétiques : médicaments dont le rôle est de réguler la concentration de glucose dans le sang (glycémie) dans le cas d'un diabète sucré (caractérisé par une mauvaise régulation de la glycémie).

Antihypertenseurs : médicaments utilisés pour soigner les symptômes de l'hypertension artérielle. Ainsi, les antihypertenseurs ne soignent pas la cause de l'hypertension, mais normalisent la tension artérielle.

Anti-inflammatoire : médicament prescrit pour lutter contre l'inflammation aiguë et, parfois, dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques, et pour atténuer certaines conséquences de l'inflammation, telles que la douleur.

Antispasmodique : Qui combat l'état spasmodique, c'est-à-dire les contractures, crampes et convulsion ; ou substance possédant cette propriété.

Antitussif : Qui combat la toux.

Arthrose : Affections chronique dégénérative non inflammatoires des articulations.

Athérosclérose : lésion artériel chronique touchant la tunique interne dans laquelle se forment des plaques jaunâtre constituées de dépôt lipidique (cholestérol). C'est une des formes de l'artériosclérose.

Auto-immune : Maladie, au cours de laquelle le système immunitaire réagit contre certains constituants de l'organisme, comme s'ils étaient des substances étrangères.

Autotrophes : peuvent fabriquer leur matière carbonée seulement à partir du dioxyde de carbone (CO₂) se trouvant dans leur milieu. Les autotrophes qui utilisent l'énergie solaire pour transformer le dioxyde de carbone en matière organique sont dits photo-autotrophes.

Bactéricide : Qui détruit les bactéries

Bactériostatiques : Qui suspend la division microbienne, provoquant vieillissement.

Bronchite : Inflammation de la muqueuse des bronches.

Cancérogène : Une substance de cancérogène si elle provoque une augmentation significative de certaines formes de proliférations cellulaires anormales.

Cellulite : Développement excessif des dépôts graisseux dans la région des hanches et des cuisses, plus fréquent chez la femme.

Chélateur : Ce dit d'une substance capable de former avec un ion chargé positivement un complexe soluble éliminable.

Crohn : Maladie de l'inflammation chronique de l'appareil digestif.

Diarrhée : Augmentation de la fréquence et de la liquidité des selles.

Diurétiques : Substances agissant sur les reins et ayant pour effet d'augmenter la quantité d'eau émise dans l'urine. La caféine, par exemple, est un diurétique léger.

Expectorant : Qui facilite l'expulsion des sécrétions bronchiques et pharyngées.

Gastro-entérite : Inflammation simultanée des muqueuses de l'estomac et l'intestin.

Glycémie : Taux de glucose dans le sang.

Hémostatique : Qui a la propriété d'arrêter un écoulement sanguin.

Hémostatique : qui a la propriété d'arrêter un écoulement sanguin.

Inflammation : Ensemble de problèmes réactionnels (chaleur, douleur, rougeur, tumeur) provoqués localement par un agent pathogène.

Ischémie : Diminution de la vascularisation artérielle, donc de l'apport sanguin, au niveau d'une zone plus ou moins étendue d'un tissu ou d'un organe

Laxatif : Médicament provoquant une accélération du transit intestinal, destiné en particulier au traitement de la constipation.

Leucocyte : Globule blanc du sang.

Mycose : Nom générique donné à toutes les affections causées par des champignons parasites de l'organisme.

Narcotiques : Substances capables de produire une insensibilité à des stimuli externes grâce à une dépression du système nerveux central et provoquant ainsi le sommeil.

Oxygène singulet : forme instable et très réactive de dioxygène.

Pathologie : Science qui a pour objet l'étude des maladies.

Peroxyde : est un composé chimique contenant un groupe fonctionnel de formule générale : R-O-O-R'. La liaison O-O est instable, le groupe fonctionnel est ainsi très réactif et peut réagir en tant qu'oxydant.

Sédatif : Calmant ; ou produit qui possède la propriété de modérer l'activité d'un organe ou appareil.

Soluté (ou solution) : Présentation liquide résultant de la dissolution d'une substance solide dans un solvant approprié (eau, alcool, huile, etc.).

Spasmolytique : Qui supprime l'état spasmodique.

Stress : Mot anglais qui exprime l'état réactionnel d'un organisme à n'importe quelle demande à laquelle il doit faire face, physique ou psychique ; et par extension, l'agression subie par cet organisme.

Teinture : Préparation médicamenteuse liquide résultant de la dissolution des principes actifs d'une ou plusieurs substances dans un liquide approprié(eau, alcool, éther, etc.).

Thérapeutique : Qui concerne le traitement des maladies ; ou partie de la médecine qui s'occupe des moyens propres à luttés contre les maladies.

Tisane : Préparation médicamenteuse liquide obtenue par infusion, décocté, solution, macération, ou digestion de substances végétales à propriétés médicinales, destinée à être bue chaude ou froide.

Tonique : Médication qui fortifie ou stimule un organe, une fonction ou l'organisme tout entier, et imprime donc une meilleure résistance vitale générale.

Ulcère : Perte de substance du revêtement cutané ou muqueux qui a peu tendance à cicatriser.

Vasoconstriction : Diminution du calibre d'un vaisseau par contraction de ses fibres musculaires.

Vasodilatation : Augmentation du calibre d'un vaisseau.

Vitamine : substance dont l'organisme ne peut faire la synthèse et dont la présence à faibles doses dans l'alimentaire

APPENDICE E

ABRÉVIATIONS

LDL :	<i>Low Density Lipoprotein</i> (les lipoprotéines de faible densité)
ATCC:	American Type Culture Collection
NCCLS:	National committed for clinical laboratory standards
EMOHf :	Extrait méthanolique en période de floraison
EMOHv:	Extrait methanolique en période de végétation
TCPv :	Teneur en composés phénoliques en période de végétation
TCPf :	Teneur en composés phénoliques en période de floraison
TFv :	Teneur en flavonoïdes en période de végétation
TFf:	Teneur en flavonoïdes en période de floraison
TTCv :	Teneur en tanins condensés en période de végétation
TTCf :	Teneur en tanins condensés en période de floraison
HPLC :	Chromatographie en phase liquide à haute performance
DAD :	Détecteur barrette de diodes
CCM :	Chromatographie sur couche mince
EMOH:	Extrait méthanolique
Ac :	Acide
DMSO :	Diméthylsulfoxyde

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bartel, A., "Guide des plantes du bassin méditerranéen", Ed Eugen wlmer, Paris, (1997), 400p.
2. Paris, P., Moyses, H., "Précis de matière médicale", 2^{ème} Ed Masson, Paris, (1976), 420p.
3. Bruneton, J., "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales" Editions Tec &Doc, Paris, (1999), 1120p.
4. Rubin.M, Messalin. J-P., "Guide pratique de phytothérapie et D'homéopathie ", Ellipes marketing, (1990).
5. Anonyme " Plantes médicinales du Maroc : Usage et toxicité", Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, bp 6202, Rabat-institut, Maroc, (2000), 137-142.
6. Bruneton, J., Hatton, C.K., "Pharmacognosy phytochemistry medicinal plants", Lavoisier technique et documentation, 3^{ème} édition, Paris et New York, (1995), 915p.
7. Ghestem, A., Seguin.E., Paris.A., Orecchioni. A .M ., "Le préparateur en pharmacie: Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie-Homéopathie", Dossier 2, TECH & DOC, Paris, (2001), 273 p,
8. Valnet, J., "Phytothérapie: traitement des maladies par les plantes", Maloine. S.A, (1983), 942p.
9. Thurzova, L., "Les plantes: Santé qui poussent autour de nous ", Edition Bordas, Bruxelles, (1981), 268p.

10. Odile, C., Roux, D., "Botanique pharmacognosie phytothérapie Cahiers du préparateur en pharmacie " 3^{ème} édition collection prophyre,(2007).
11. Schauenberg, P., Paris, F., "Guide des plantes médicinales ", Delachaux & Niestlé, Paris, (2005), 396p.
12. Beloued, A., "Plantes médicinales d'Algérie ", Office des publications Universitaire, (2005), 122p.
13. Nogaret-Ehrhart, A- S., "La phytothérapie : se soigner par les plantes", Groupe Eyrolles, Paris, (2006), 191p.
14. Delille, L., "Les plantes Médicinales d'Algérie ", édition BERTI, (2007), 155-156.
- 15- Bernadet, M., "La phyto-aromatothérapie pratique ", Bangles, France, (1983), 384p.
16. Poletti, A., "Fleurs et plantes médicinales ", Delachaux & Niestlé, Paris, (1987), 191p.
17. Kholkhal, F., "Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénolique de *Thymus ciliatus ssp coloratus et ssp ciliatus* ", thèse de doctorat en Biologie, université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, (2013), 164p.
18. Boutelis, D. A., "Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* ", thèse de doctorat en science, université Badji Mokhtar – Annaba, (2013), 73p.
19. Quezel, P., Santa, S., "La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales ", Tome II, Ed : CNRS. Paris, (1963), 801-802.

20. Benabdelkader. T., "Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des Composes Terpéniques Volatils des Lavandes Ailées, *Lavandula stoechas* Sensu Lato, un Complexe d'Espèces Méditerranéennes d'Intérêt Pharmacologique ", thèse de doctorat, université de l'ENS en Biologie et Ecophysiologie Végétale Biodiversité, Kouba- Algérie, (2012), 239p.
21. Bonnier. G et Douin. R., "La grande flore en couleurs de Bonnier Gaston", éditions belin, (1990), Paris, p 937.
22. Iserin, P., "Larousse des plantes médicinales", Larousse, (2007), 291p.
23. Judd. W.S., Campbell. C.S., Kellogg. E.A., Steven. P., "Botanique systématique: Une perspective phylogénétique ", 1^{ère} ED, Paris et Bruxelles, (2002), 459p.
24. Boudjelal A., Henchiri. C., Siracusa, L., Sari, M and Ruberto, G., "Compositional analysis and in vivo antidiabetic Activity of Wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion", *Fitoterapia*, (2012), 83:286 - 292.
25. Amessis-Ouchemoukh N., khodir. M., et *al.*, "Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities", *Industrial Crops and Product*, 53(2014), 6-15.
26. Ghedabda, H., Bousselsel, L., Hambaba, Sioxydante et., Benbia, Y et Mouloud, Y., "Evaluation de l'activité antimicrobienne des feuilles et des sommiés fleuries de *Marrubium vulgare* L", *Phytothérapie*, 12(2014), 15-24
27. Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M., Bailleul, F., "Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*", *J Ethno- pharmacol* (2002), 79:389–92.

28. De Oliveira, Santin, J.R., Lemos, M., Klein Junio, L.C., Couto, A.G., Da Slivia Bittencourt, C.M., Fliho, V.C et De Andrade, S.F., "Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from leaves of *Marrubium vulgare* (Lamiaceae)", JPP, (2011), 63:1230-1237.
29. Matkowski, A., Tasarz, P and Szypuła, E., "Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*", Journal of Medicinal Plants Research, (2008), 2 (11): 321-330.
30. Lahsissene, H., Kahouadji, A., Tijane, M. et Hseini, S., "Catalogue des Plantes Médicinales utilisées dans la région de ZAËR (Maroc Occidental)", Revue de Botanique Nouvelle série N° 186 (2009).
31. Raynaud J., "Prescription et conseil en phytothérapie", Ed : Tec & Doc. Paris, (2007), 149p.
32. Pukalskas, A., Venskutonis, P., R et al., "Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L) cultivated in Lithuania", Journal Food Chemistry, V 130, (2012), 695-701.
33. Wojdyło, A., Oszmianski, J., Czemerys, R., "Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs", Food Chemistry, (2007), 105: 940- 949.
34. Akther, A., Shawl, A.S., et al., "Hepatoprotective activity of *Marrubium vulgare* against paracetamol induced toxicity", Journal of Pharmacy Research, 7 (2013), 565-570.
35. Lutge, U., Kluge, M., Bauer, G., "Technique et documentation", Lavoisier, Paris, (2002), 211p.
36. Koechline-Ramonatxo, C., "Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases". Nutrition Clinique et Métabolique. (2006), 20:165-177.

37. Theirry, H., Sahpaz S., Bailleu, F., "Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif», phytothérapie, 1(2004), 3-6.
38. Chopra, R.N., Nayar, S.L. and Chopra, I.C., "Glossary of Indian medicinal plants (Including the supplement) ", Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, (1986).
39. Guignard, J.L., "Abrégé de biochimie végétale", Ed. Masson, Paris, (1996), 160p.
40. Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., Stöckigt, D., "High performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups", Journal of chromatography, (2002), 967: 85- 113
41. Ait Youssef, M., "Plantes médicinales de Kabylie", Ibispress, (2006),17-19.
42. Heim, E.K., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., "Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships", The Journal of Nutritional Biochemistry, (2002) 13: 572-584.
43. Ramla, B., "Extraction des flavonoïdes des plantes *Inulva viscosa* de la région d'Oran et la mis en évidence des activités microbienne", mémoire de magister en chimie moléculaire et biomoléculaire université d'Oran, (2013).
44. Joslyn, M.A., Goldstein, J.L., "Astringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content", Adv Food Res, 13(1964), 179 -217.
45. Kreofsky, T., Shlager, J.K., Vuk-Pavlovic, Z., Abraham, R.T., Rohrbach, M.S., "Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbitresident alveolar macrophage", Am. J. Resir. Cell. Mol. Biol.7, (1992), 172-181.

46. Macheix, J. J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., "Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique", Press polytechniques et universitaire Romande. Lausanne. (2005).192p.
47. Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V., "Les polyphénols en agroalimentaire", Lavoisier, (2006), Editions TEC&DOC ,398p.
48. Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila,A.,Skandrani, I.,Falleh, H. et Marzouk, B., "Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots", Comptes Rendus Biologies, V 331, (2008), 48–55.
49. Abedini, A., "Evaluation biologique et phytochimique des substance naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit (Lamiaceae), sélectionnée par criblage d'extraits de 42plantes ", mémoire de doctorat en pharmacognosie université de Lile Nord de France, (2013), 198p.
50. Grundwald, J., Janicke, C., "Guide de la phytothérapie ", Edition Marabout, (2004), 341-342.
51. Hopkins, W.G., "Physiologie végétale : Molécules et métabolisme", De Boeck, Paris, (2003), 273-513.
52. Didry, N., Pinkas, M., Torck, M., "Sur la composition chimique et activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de *Grindelia*. P1", Med. Phyto. XVI, 7-18.
53. Ravn, H., Andary, C., Kovacs,G., Molgard, P., "Cafeic acid esters as in vitro inhibitor of plant pathogenic bacteria and fungi", Biochem. Syst. Ecol.17, (1984), 175-184.
54. Mabry, T.G., Ulubelen, A., "Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoides, coumarins and lignans", J. Agric. Food Chem.V.28, (1984), 188-196.

55. Prasad, M.M., Seenayya, G., "Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt", *Food Research International* (2000), 33: 793-798.
56. Chambers, H. F., "Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications", *Clin. Microbiol. Rev*, (1997), 10: 781- 791.
57. Mukamolova, G.V., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., "On resuscitation from the dormant state of *Micrococcus luteus*", *Antonie van Leeuwenhoek*, n° 73, (1998), 37- 43.
58. Mukamolova, G.V., Murzin, A.G., Salina, E.G., Demina, G.R., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Young, M., " Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation", *Mol Microbiol*, n° 59, (2006), 84-98.
59. Greenblatt, C.L., Baum, J., Klein, B.Y., Nachshon, S., Koltunova, V., Cano, R.J., "*Micrococcus luteus* survival in amber ", *Microb, Ecol*, n°48, (2004).
60. Marchadier, E., "Etude fonctionnelle d'un centre d'interactions protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée", mémoire de doctorat, spécialité science de la vie, université Paris Xivfr Scientifique d'Orsay, (2009), 6p.
61. Nataro J. P., Kaper J. B., "Diarrheagenic *E. coli* ", *Clin Microbiol Rev*, (1998), 11: 142-201.
62. Philippon, A., "Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques", *Lett. Infectiol.* (1995), 10 : 619-630.
63. Fuerst, F., "Microbiologie Clinique", Ed HRW Québec, (1976), 507 p.

64. Pieri, F., Kirkiacharian, S., "Pharmacologie et Thérapeutique", 2ème édition Marketing, Paris, (1992), 443 p.
65. Bergogne-Berezin, E., Dellamonica, P., "Antibiothérapie en pratique clinique", Ed Masson, Paris, (1995), 486 p.
66. Billing, J., Sherman, P. W., "Antimicrobial function of spices ", Q Rev Biol, (1998), 73: 3 - 49.
67. Birt, D. F., Hendrich, S., Weiqun, W., "Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids ", Pharmacol Therap, (2001), 90: 157-177.
68. Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R., Bernigault R. "Mesure de la résistance aux radicaux libres ", Sixièmes Journées de la Recherche Avicole, (2005), 554-558.
69. Boyd, B., Ford, C., Koepke, Michael, C., Gay, K., Mc Analley, S et Mc Analley, B., "Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Anbrotose AOTM sur des personnes en bonne santé ", Glyco-science et Nutrition, (2003), 7.
70. Theirry, H., "Investigation Chimique, Chimiotaxonomique et Pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodidannus* (lamiacées) et *lippia alba* (Verbénacées) ", mémoire de doctorat en chimie organique et macromolécules, Lille- France, (2006), 304p.
71. Sorg, O., "Oxidative stress a theoretical model or a biological Reality ", Comptes Rendus Biologies, (2004), 327: 649-662.
72. Densiov, E.T., Afanas'ev, I.B., « Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology". Eds: Taylor & Francis, Group (U.S.A), (2005), 703-861.
73. Meziti, A ., "Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L, Etude in vitro et in vivo », (2008), université d'El-Haj lakhdar, Batna.

74. Atawodi, S. E., "Antioxidant potential of African plants. *African*", J. of Biotech, (2005), 4 (2): 128-133.
75. Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini Ana ECS et Fonseca Maria J.V., "Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method", AAPS Pharm Sci, (2003), 5 (2): 5p.
76. Durackova, Z., Djrolo, F., Hougbe, H., Avode, G., Attoulou, V., Addra, B., Kodjoh, N., Avimadj, M., "Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress", Mitochondrial medicine, Gvozdjakova A (ed), (2008), 19-43.
77. Harborne, J.B., "The flavonoids : recent advances", Goodwin TW, Academic Press Londres, (1988), 229- 313.
78. Delattre, J., "Radicaux libres et stress oxydant : Aspect biologiques et pathologiques", Edition Tec et Doc, (2007).
79. Collin, S., Crouzet, J., "Polyphénols et procédés", Ed TEC&DOC, Lavoisier, (2011), p 5.
80. Masquelier, J., Dumon, M.C., Duma, J., "Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques", Acta thérapeutique.1, (1979), 101-104.
81. Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A et al., "Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mirxtus*". Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 146, (2008), 85-96.
82. <http://www.infoclimat.fr/climatologiemensuelle/60437/aout/2014/medea.html>
83. Zerrad, W., Hillali. S., Mataoui, M., El antris, B.S., Et hmeyen, A., "Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur", Laboratoire de Biochimie, d'environnement, Maroc, (2006), 1p.

84. Touaibia, M., "Contribution a l'étude de deux plantes médicinales : Obtenues in Situ et in Vitro", thèse de magister, université Blida 1, (2011), 186p.
85. Martin, P.P., Gagnard, J., Gautier, P., Drouineau, G., "L'analyse végétale de l'alimentation des plantes tempérées et tropicales", Lavoisier, Paris, (1984).
86. Diarra, M-N., "Etude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali : *Spilanthes oleracea*. Jacq. (Asteraceae)", Thèse de doctorat d'état en Pharmacie, Université de Bamako, Mali, (2003), p78.
87. Tounkara, A., "Etude de l'activité hépatoprotectrice de deux plantes médicinales du Mali", thèse de doctorat en pharmacie, université de Mali, (2005), 169p.
88. Ciulei, I., "Methodology for analysis of vegetable drugs", edition UNIDO, (1983), 76p.
89. Diallo, A., "Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense Willd*", Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako, Mali, (2005), 99p.
90. William, B. J., "The Original of the Soxhlet extractor", Journal of Chemical Education, V. 84, n°12, Canada, (2007), p1913.
91. Amrani, O., "Valeur nutritive du Chardon marie (*silybum marianum*)", mémoire de magistère agronomie, université de Batna, 2006.
92. Chebaki, R., "Etude Phytochimique de *Scrophularia saharae* (deserti. Coss) », mémoire de magistère en chimie, université de Batna, 2006, 46.
93. Fiorucci, S., "Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire", Thèse de doctorat. Université Nice-Sophia

Antipolis, (2006), 212 p.

94. France-Ida, J., "Analyse de produits naturels de *Taxus canadensis*", université du Québec memoire présenté à l'université du Québec à Cfflcoutimi comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables, chimie, (1992), p99.
95. Silverstein, R., Basler G-C., Morill, T. C., "Identification spectrométriques de composées organiques", Edition De Boeck, Bruxelles, (1998), 411p.
96. Rouessac, F., Rouessac, A., "Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes", Edition DUNOD, Paris, (2006) ,462p.
97. Wong, C.C., Li, H.B., Cheng, K.W., Chen, F. "A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay ", Food Chem, (2006) 97: 705-711.
98. Boizot N., Charpentier J P., 2006. "Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques ", n° spécial, 79-83.
99. Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., vasseur J., Cazin, M., Cazin, C et Pinkas, M., "Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations .*Arzneimittel-Forschung* ", (1996). 46(11):1086-1089.
100. Chupin, L., Motillon, C., Charrier-Elbouhtoury, F., Pizzi, A., Charrier, B., "Characterisation of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark tannins extracted under different conditions by spectroscopic methods ,FTIR and HPLC industrial corps and products", 49 (2013) , 897-903.
101. Matkowski, A., Tasarz, P. and Szypuła, E., "Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae", Journal of Medicinal Plants Research, (2008), 2 (11): 32-330.

102. Wang, G., Mazza, G., "Effect of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophage", J. Agric. Food Chem. 50, (2002), 4381- 4383.
103. Maataoui, B.S., Hmyene, A. and Hilali, S., "Activit es anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*)". Lebanese Science Journal, (2006), 7(1):3-8.
104. Yildirims, A., Mari, A et Kara, A.A., "Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts ", J Agric Food Chem, V. 49, n  8, (Aout 2001), 4083-4089.
105. Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila,A., Skandrani, I., Falleh, H. et Marzouk, B., "Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots" , Comptes Rendus Biologies, V. 331, (2008), 48–55.
106. Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C. "Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations ", Food Chem. (2007), 100: 553-559.
107. Moreira, M.R., Ponce, A.G., Delvalle, C.E., Roura, S.I., "Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food borne pathogen ", (2005), 565-570.
108. Elberry, A.A., Fathalla, M et al., "Methanolique extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin induced diabetic rats", International Journal of Diabetes Mellitus, (2011), 1877-5934.
109. Kanyonga, P.M., Faouzi, M. A ., Meddah, B., Mpona, M., Essassi, E.M., Cherrah, Y., "Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for

antiinflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities”, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, (2011), 3: 199-204.

110. Garcia-Pérez, M.E., “Caractérisation de composés phénoliques des extraits de Ramilles du Bouleau Jaune : étude de leur capacité antioxydante ”, mémoire du grade de maître en sciences, université Laval, Québec, (2008).
111. Boutelis, D. A., Bordjiba, O., Bentherrara,S., “Extraction, séparation antibacterienne des tannins de marrube blanc (*Marrubium vulgare*) ”, *Phytothérapie*, (2013) ,11 :348-352.
112. Bouterfas, k., Mehdadi, Z., Latreche, A., Hazem, Z., Bouredja, N., “Quantification de quelques polyphénols de *Marrubium vulgare* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale) pendant les deux périodes de végétation et floraison ”, *Les technologie de laboratoire*, V8, n°31, (2013).34-41.
113. Aouadhi, C., Ghazghazi, H., Hasnaoui, B., Maaroufi, A., “Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of *Marrubium vulgare* methanolic extract” , *Tunisian Journal of Medicinal Plants and Natural Products*, (2014) 11(1): xx-xx.
114. Wojdyłoa, A., Oszmianski , J., Czemerys, R., “Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs”, *Food Chemistry*, (2007), 105: 940-949.
115. Bouterfas,K., Mehdadi,Z., Latreche, A., Aouad., “Pouvoir antimicrobien des flavonoides extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L en provenance du mont de Tessala Algérie occidentale”, *Phytothérapie*, (2014), 12:6-14
116. Mohsen, S.M., Ammar, ASM “Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts”, *Food Chem* , (2009),112: 595–598.

117. Mehinagic, E., Bourles, E., Jourjon, F., "Composés des fruits d'intérêt nutritionnel : impact des procédés de transformation sur les polyphénols ", *Revue suisse de Viticulture Arboriculture Horticulure*, V.34(2011), 6:364-368.
118. Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Benmansour, D., Meghit Boumediene, K., Bouterfas, M., Latreche, A., "Optimization of Extraction Conditions of Some Phenolic Compounds from White Horehound (*Marrubium vulgare* L.) Leaves", *International Journal of Organic Chemistry*, 4(2014), 292-308.
119. Lee, S.E., Hwang, H.J., Jeong, H.S., and Kim, J.H., "Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity", *Life Science*, 73(2003), 167-179.
120. Ebrahimi, N.S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A., Yousef Zadi, M., "Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages", *Food chemistry*, 110, (2008), 927-931.
121. Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., and Van Beek T.A. "Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract", *Food chemistry*, (2004), 85 : 231-237.
122. Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S., "Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L ", *Lebanese Science Journal*, V.11, n°1, (2010).
123. Milan, S., "Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium pergrinum* , extraction", *Kragujevac, J.Sci*,33(2011), 63 - 72.
124. Turkmen, N., Velioglu, Y. S., Sari, F., Polat, G., "Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*", (2007), 12: 484-496.

125. Molyneux, P., "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) of estimating antioxidant activity ", Journal of Science Technology, V.26, n°2, (2004), 211-219.
126. Javanovic, S.V., Steenken, S., Tomic, M., Marjanovic, B., Simic, M.J., "Flavonoids as antioxidants", Journal of the American Chemical Society, (1994), 116: 4846-4851.
127. Chang, S. T., Wu, J. H., Wang, S. Y., Kang, P. L., Yang, N. S., et Shyur, L. F., "Antioxidant activity of extracts from Acacia confusa bark and Heart wood", Journal of Agricultural & Food Chemistry, V. 49, n° 7,(2001), 3420–3424.
128. Ismail, H. I., Chan, K. W., Mariod, A. A., Ismail, M., "Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (cucumis melo) methanolic extracts", Food Chemistry, V. 119 , (2010), 643–647.
129. Moussaoui, T., "Contribution à l'étude de la qualité nutritionnel et à la valorisation des composés phénoliques du fruit de la Grenadier (*Punica granatum L*) de la région de la Mitidja", mémoire de magister en Nutrition Transformation des aliments, Université Blida1, Algérie, Avril (2015), 140-141.
130. Ghazghazi, H., Aouadhi. C, Maaroufi, A., Hasnaoui, B., "Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du nord de Tunisie", Microbiol. Hyg. Alim., V.25, (juillet 2013), n° 73.
131. Prescott ., Harley., Klein., Wiley., Sherwood., Woolverton ., "Microbiologie" ,3^{ème} édition de bock, (2010), 842-846p.
132. Voet, D., Voet, J. G., "Biochimie", 2^{ème} édition de boeck, (2004), p235.

133. Dehbashi, Z., Mazaheri, M., Saeedi, S., Sabbagh, S. K., "Antibacterial activity of *Marrubium vulgare* L. against antibiotic resistance *Klebsiella pneumoniae* strains", *Advanced Herbal Medicine*, 2015, 1(3): p 9-14.
134. Omulokoli, E., Khan, B. et Chhabra, S., "Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants », *Journal of Ethnopharmacology*, (1997), V.56, 133–137.
135. Benouaklil, F., "Etude d'une plante *Chrysanthemum coronarium* L ", mémoire de magister en Biotechnologie végétale, université de Blida1, 2012, 98p.
136. Kanyonga, P.M., Faouzi, M.A., Meddah, B., et *al.*, "Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and antimicrobiologic activities", *J Chem Pharm Res*, (2011) 3: 199 – 204.
137. Dacosta, Y., "Les phytonutriments bioactifs", Ed Yves Dacosta, Paris, (2003), 317 p.
138. Small, E., Catling, P.M., "Les cultures médicinales canadiennes", Presses scientifiques du CNRC, Ottawa (Ontario), Canada, (2000), p281.
139. Massaux, C., "Polyphenols des alliés pour la santé ", Abeilles et C^{ie}, n°149, 4- (2012), 1-4.
140. Vermerris, W., Nicholson, R., "Phenolic compound biochemistry", Ed Springer, Gainesville. U.S.A, (2006), 285p.
141. Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J., "Biological activities and distribution of plant saponins, *Journal of Ethnopharmacology*", (2004), 94: 219- 243.
142. Attele, A.S., Wu, J.A., Yuan, C.S., "Ginseng pharmacology. Multiple constituents and multiple actions, *Biochem. Pharmacol*, (1999), 58:

1685-1693.

143. Selle, C., "Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen: *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5M", mémoire de doctorat en chimie physique, université Abou Bekr Belkaid Tlemcen ,(2012) 175p.
144. Favier, A., "Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel", thérapeutique L'actualité chimique, (2003), 108-115.
145. Cavin, A., "Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés anti oxydantes et anti radicalaires : *Tinospora crisp*, *Merremia emarginata*, *Orophera enneadra*", mémoire doctorat, Lausanne, (1999), 243p.
146. Meyre-Silva, C., Cechinel-Filho., V., "A Review of the Chemical and Pharmacological Aspects of the Genus Marrubium", Current Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3503-3518.
147. Anonyme., "Pharmacopée européenne". 4eme édition. Conseil de l'Europe. Strasbourg, (2002). 2060p.ss
148. Cottiglia, F., Loy, G., Garan, D., Floris, C., Casu, M., Pompei., R., Bonsignore L., "Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L", Phytomedicine, 8(4), (2001), 302-305.
149. Anonyme., "Pharmacopée européenne". Tome I. Conseil de l'Europe. Strasbourg, (2005). 3343p.
150. www.infoclimat.fr

151. Bensalem, M., Bendjelloul., D., “ Technique histologique: théorie et pratique”, Office des publications Universitaire(OPU), Alger, (1998), 56-57.

152. Chabane, D., “Etude d’une plante a caractère thérapeutique *Ajuga iva*” mémoire de magister en Biotechnologies Végétales, 2012, p36.