

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
جامعة الجبلاي بونعامة خميس مليانة  
Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana  
Faculté des Sciences et de la Technologie  
Département des Sciences de la Matière



*Mémoire de fin d'étude*  
En vue de l'obtention d'un diplôme de **Master** en Chimie  
*Spécialité : Chimie Pharmaceutique*

**Thème :**

Contribution à l'étude phytochimique de la plante  
*Marrubium vulgare L.*

**Devant le jury composé de :**

Encad. : K. Hachama

Exam.1 : A. Itatahine

Exam.2 : B. Mekhaneg

**Présenté par :**

Benabderrahmane Wafaa

Djellaili Imene

**Année universitaire : 2019 / 2020**

## *Remerciement*

*Tout d'abord, nous tenons à remercier Dieu de nous avoir donné la santé, la volonté et la patience de réaliser ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à :*

*Notre promoteur Mr Kamel HACHAMA qui nous a guidés de ses précieux conseils et suggestions et, la confiance qu'il nous a témoignés tout au long de ce travail.*

*Nous tenons également à exprimer nos reconnaissances aux membres de jury :*

*Mr Benyoucef Mekhaneg et M<sup>elle</sup> Asmaa Itatahine qui nous ont fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*Nous tenons à remercier également tous ceux qui nous ont aidés de près et de loin pour l'élaboration de ce mémoire.*

*Merci à tous...*

*Wafaa & Imene*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A ma chère mère,*

*A mon cher père,*

*Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon  
égard, de me soutenir et m'épauler pour que je puisse  
atteindre mes objectifs.*

*A mes sœurs, Hanaa et Malak*

*A mes frères, Youcef et Younes*

*Ceux qui ont partagé avec moi tous les moments  
d'émotion lors de la réalisation de ce travail, et qui  
m'ont toujours soutenu et encouragé durant ces  
années d'études.*

*A tous mes amis,*

*A tous ceux que j'aime,*

*Wafaa*

## *DEDICACE*

*Je dédie ce travail à :*

*Ceux qui sont les plus chères au monde :*

*A mes parents*

*Qui m'ont tout donné sans rien en retour, qui ont sacrifié leur vie pour que je puisse réussir et qui par leur attention, leur Compréhension et leur soutien m'ont Permis d'atteindre mes objectifs et concrétiser mes rêves.*

*A mes chères sœurs et mes chers frères*

*Pour votre soutien moral et encouragements, vous m'avez appris la patience et la concentration sur mon travail. Je vous souhaite un avenir plein d'amour, de bonheur et de succès. Je vous aime beaucoup.*

*À toute ma famille,*

*A tous mes amis,*

*Que j'ai vécu avec eux des beaux moments au cours de mon cursus à l'université.*

*IMENE*

## Liste des tableaux

| Tableau     | Titre   | Page      |
|-------------|---|-----------|
| <b>I.1</b>  | Classification botanique de <i>Marrubium vulgare</i> L.   | <b>05</b> |
| <b>I.2</b>  | Différentes appellations de <i>Marrubium vulgare</i> en plusieurs langues.  | <b>06</b> |
| <b>I.3</b>  | Principales actions biologiques proposées pour <i>Marrubium vulgare</i> L.  | <b>10</b> |
| <b>I.4</b>  | Indications thérapeutiques et proposition de dosage pour la partie aérienne de <i>Marrubium vulgare</i> L reconnues par l'EMA et la Commission allemande E. | <b>12</b> |
| <b>I.1</b>  | Conditions opératoires de CG/SM.  | <b>36</b> |
| <b>I.2</b>  | Rendement en huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i> récolté de différentes régions.  | <b>37</b> |
| <b>I.3</b>  | Les principaux constituants de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i> .  | <b>39</b> |
| <b>I.4</b>  | Métabolites secondaires mis en évidence dans <i>Marrubium vulgare</i> .   | <b>45</b> |
| <b>I.5</b>  | Teneur en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux de différentes parties de M. vulgare.   | <b>46</b> |
| <b>I.6</b>  | IC <sub>50</sub> de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i> de différentes régions en µg/ml.  | <b>49</b> |
| <b>I.7</b>  | IC <sub>50</sub> des extraits de <i>Marrubium vulgare</i> en µg/ml.   | <b>50</b> |
| <b>I.8</b>  | Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition.  | <b>52</b> |
| <b>I.9</b>  | Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i> .   | <b>53</b> |
| <b>I.10</b> | Activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i> L.   | <b>54</b> |
| <b>I.11</b> | Activité antibactérienne des extraits organiques et aqueux de <i>Marrubium vulgare</i> .  | <b>55</b> |
| <b>I.12</b> | Activité antifongique des extraits organique de <i>Marrubium vulgare</i> .  | <b>58</b> |

## Liste des figures

| Figure       | Titre   | Page      |
|--------------|---|-----------|
| <b>II.1</b>  | Répartition géographique de la famille des Lamiacées dans le monde entier.                          | <b>3</b>  |
| <b>II.2</b>  | L'espèce <i>Marrubium vulgare</i> L.  | <b>4</b>  |
| <b>II.3</b>  | La plante <i>Marrubium vulgare</i> L.   | <b>5</b>  |
| <b>II.1</b>  | Structure chimique de quelques composés phénoliques.  | <b>17</b> |
| <b>II.2</b>  | Structure chimique de quelques acides phénoliques.  | <b>17</b> |
| <b>II.3</b>  | Structures de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone.   | <b>18</b> |
| <b>II.4</b>  | Structure chimique des tanins hydrolysables.  | <b>19</b> |
| <b>II.5</b>  | Structure chimique des tanins condensés.  | <b>19</b> |
| <b>II.6</b>  | Structure chimique de la morphine.  | <b>21</b> |
| <b>II.7</b>  | Structure de quelques composés à base des terpènes.   | <b>22</b> |
| <b>II.8</b>  | Structures chimiques des différentes classes des terpénoïdes.                                       | <b>23</b> |
| <b>II.9</b>  | Structures chimiques de quelques saponines.   | <b>24</b> |
| <b>II.10</b> | Principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles.              | <b>28</b> |
| <b>II.1</b>  | Variation de rendement de l'HE de <i>Marrubium vulgare</i> dans différentes régions.                | <b>38</b> |
| <b>II.2</b>  | Composés majoritaires identifiés dans l'HE de <i>Marrubium vulgare</i> .                            | <b>42</b> |
| <b>II.3</b>  | Mécanisme réactionnelle du DPPH avec un antioxydant.  | <b>48</b> |
| <b>II.4</b>  | IC <sub>50</sub> de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i> obtenu par différentes régions. | <b>49</b> |

## Liste des symboles et abréviations

*A. flavus* : *Aspergillus flavus*

*A. niger* : *Aspergillus niger*

*A. ochraceus* : *Aspergillus ochraceus*

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

*C. albicans* : *Candida albicans*

*E. coli* : *Escherichia coli*

**EMA** : Agence Européenne des médicaments

*F. culmorum* : *Fusarium culmorum*

**HA**: hydrolat

**HDL** : lipoprotéine de haute densité

**HE** : huile essentielle

**IC<sub>50</sub>** : concentration inhibitrice à 50%

**IT**: inhibition totale

*K. pneumonia* : *Klebsiella pneumonia*

*L. monocytogène* : *Listeria monocytogène*

**LDL** : lipoprotéine de basse densité

*M. vulgare* : *Marrubium vulgare*

**M.S** : métabolite secondaire

**NO** : l'oxyde nitrique

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

*P. mirabilis* : *Proteus mirabilis*

**Ph.eu** : pharmacopée européenne

**Réf** : référence

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

***S. enterica*** : *Salmonella enterica*

**SFE** : extraction par fluide supercritique

**SFME** : Solvent Free Microwave Extraction

**tid** : trois fois par jour

**Tr** : trace

## الملخص

المريوط هو نبات طبي ينتمي إلى عائلة النعناع. تم استخدامه قديماً لأغراض عديدة بما في ذلك علاج أمراض المعدة، السكري وتعفن الجهاز التنفسي والرئوي. كما أنه يملك أيضاً خصائص واقية للأعصاب، مضادة للتشنج، خافضة للضغط وللكوليسترول. بالإضافة إلى ذلك، فإنه يُظهر نشاطاً قوياً كمضاد للأكسدة ومضاد للميكروبات خاصة ضد بكتيريا جرام (+) مثل *ستافيلوكوكيس اوريوس* و *ليستيريا مونوسيتوجان* والفطريات. أظهرت العديد من الدراسات الكيميائية النباتية أن النبات يحتوي على الزيت الأساسي والتانينات والقلويات والصابونين والفلافونويد، والتي يتأثر تكوينها بالمنطقة الجغرافية ومرحلة نمو النبات وموسم الحصاد.

نظراً لخصائصه الدوائية، فإن الزيت الأساسي والمستخلصات العضوية والمائية لنباتة المريوط تمثل مورداً طبيعياً مهماً لصناعة الأدوية والمبيدات. الهدف من هذا العمل هو تقديم تحليل للعمل العلمي حول الاستخدامات الكيميائية النباتية والدوائية والطبية لنبات المريوط، ولا سيما في الجزائر وتونس.

**الكلمات المفتاحية:** نبات المريوط، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، زيت أساسي، مستخلص عضوي، مستخلص مائي.

## Résumé

*Marrubium vulgare* est une plante médicinale appartenant à la famille des lamiacées. Elle est traditionnellement utilisée à des nombreuses fins, notamment pour le traitement des maladies de l'estomac, du diabète sucré, des infections respiratoires et pulmonaires. Elle possédait ainsi des effets neuroprotecteur, antispasmodique, antihypertenseur et hypo-cholestérol. En outre, elle montre une forte activité antioxydant et antimicrobienne particulièrement, contre les bactéries Gram (+) tels que *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogène* et les champignons.

Nombreuses études phytochimique ont montrés que la plante contenait de l'huile essentielle, des tanins, des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes dont, la composition est affectée par la région géographique, le stade de développement de la plante et la saison de récolte.

En raison de ses propriétés pharmacologiques, l'huile essentielle, les extraits organiques et aqueux de *Marrubium vulgare* représente une importante ressource naturelle pour l'industrie pharmaceutique et pesticide. Le présent travail a pour but de présenter une analyse des travaux scientifiques sur les propriétés phytochimiques, pharmacologiques et les utilisations médicinales de M. vulgare, notamment en Algérie et en Tunisie.

**Mots clés :** *Marrubium vulgare*, activité antioxydant, activité antimicrobienne, huile essentielle, extrait organique, extrait aqueux.

## Abstract

*Marrubium vulgare* is a medicinal plant belonging to the Lamiaceae family. It is traditionally used for many purposes, including the treatment of stomach diseases, diabetes mellitus, respiratory and pulmonary infections. It had neuroprotective, antispasmodic, antihypertensive and cholesterol-lowering effects. In addition, it shows a strong antioxidant and antimicrobial activity particularly, against Gram (+) bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* and fungi.

Numerous phytochemical studies have shown that the plant contains essential oil, tannins, alkaloids, saponins and flavonoids whose composition is affected by the geographical region, the stage of development of the plant and the harvest season.

Because of its pharmacological properties, the essential oil, organic and aqueous extracts of *Marrubium vulgare* represents an important natural resource for the pharmaceutical and pesticide industry. The aim of this work is to present an analysis of the scientific work on the phytochemical and pharmacological properties and medicinal uses of M. vulgare, particularly in Algeria and Tunisia.

**Keywords:** *Marrubium vulgare*, antioxidant activity, antimicrobial activity, essential oil, organic extract, aqueous extract.

## *Introduction générale*

## **Introduction générale**

Les produits naturels d'origine végétale, animale et minérale ont été à la base du traitement des maladies humaines, ils sont considérés comme une source d'agents médicinaux depuis des milliers d'années et un nombre impressionnant des drogues moderne ont été isolées à partir de sources naturelles, dont beaucoup sont basées sur leur utilisation dans la médecine traditionnelle [1].

Les médicaments à base de plantes, peu toxique et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques, sont actuellement très demandés et leur popularité augmente de jour en jour. En fait, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a indiqué qu'environ 70 à 80 % de la population mondiale utilise des plantes médicinales pour leurs effets thérapeutiques. Parmi les 250 000 espèces végétales signalées dans le monde, presque 50 000 à 80 000 sont utilisés à des fins médicinales par les peuples du monde entier. Les industries pharmaceutiques sont de plus en plus intéressées par l'étude ethnobotanique des plantes [2,3].

Le nord-africain, de part sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques auxquels s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement des cultures intensives des plantes aromatiques médicinales [4].

Les feuilles alimentées en éléments simples (eau, sels minéraux, oligo-éléments) et, recevant l'énergie du soleil, synthétisent un ensemble de molécules organiques très complexes qui sont des agents des vertus médicinales du monde végétal [5].

L'étude des huiles essentielles et de composés phénoliques est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels des biotechnologies végétales [4].

Dans ce travail nous nous sommes intéressées à espèce végétale dite *Marrubium vulgare* L., utilisée largement en médecine traditionnelles à travers le monde, particulièrement dans la zone méditerranéenne pour ces propriétés pharmacologique et principalement les propriétés antioxydante, antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle et de ces extraits aqueux et organiques.

Dans ce contexte, nous allons traiter ce sujet en trois chapitres :

Le premier chapitre comprend une présentation botanique de la plante *Marrubium vulgare* et ces propriétés pharmacologiques.

Le second chapitre traite les différents métabolites secondaires et leurs propriétés biologiques, des définitions et caractérisation des huiles essentielles, leurs méthodes d'extractions et d'identifications.

Et le troisième chapitre sera consacré à établir une comparaison des résultats obtenues par certaines études antérieures sur l'étude phytochimique, les propriétés pharmacologiques et des activités biologiques de *Marrubium vulgare* L. de l'Algérie et de la Tunisie au cours des dernières années.

Enfin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats exposés.

*Chapitre I :*

*Présentation de la plante Marrubium vulgare L*

## **I.4.Généralités et définitions**

### **I.1.1. Les plantes médicinales**

Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles [6].

- Selon l'OMS, « une plante médicinale est une plante qui contient, dans un ou plusieurs de ses organes, des substances qui peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques, ou qui sont des précurseurs de la chimio-pharmaceutique hémisynthèse ».

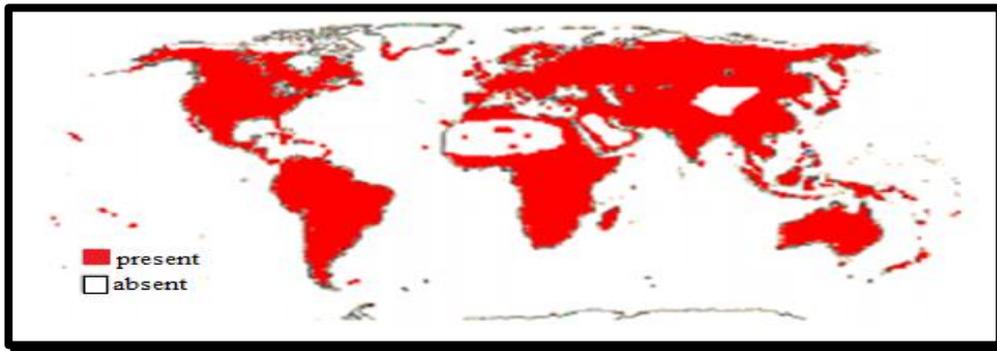
### **I.1.2. Une plante aromatique**

Est un végétal qui contient, dans un de ses organes (feuille, fruit, fleur, graine, écorce...), des molécules odorantes [7].

### **I.1.3. Les Lamiacées**

Les Lamiacées sont la famille de plantes la plus diversifiée en termes d'ethnomédecine. En raison de son contenu volatil élevé, il a une grande valeur médicinale. Il contient environ 236 genres et 6900-7200 espèces. De nombreuses espèces de cette famille sont très aromatiques et produisent de l'huile volatile, en raison de la présence de structures glandulaires externes. Les lamiacées sont également taxonomiquement connues sous le nom de famille de plantes à fleurs de menthe [8].

La distribution géographique des lamiacées est universelle. Les lamiacées sont rencontrées sous tous les climats, à toutes les altitudes. Certains des 260 genres que compte la famille sont quasiment universels, d'autres ont une distribution plus restreinte, rare dans le milieu forestier tropical. Les lamiacées se concentrent particulièrement dans la région méditerranéenne [9,10].



**Figure I.1:** Répartition géographique de la famille des Lamiacées dans le monde entier [11].

## I.2. Description, classification botanique et propriétés de *Marrubium vulgare* L

Le genre *Marrubium* comporte quelque 40 espèces, répandues principalement le long de la méditerranée, les zones tempérées du continent eurasiatique et quelques pays d'Amérique Latine [12,13]. En Algérie, l'espèce *Marrubium vulgare* L. est assez commune de l'ensemble du territoire, très présente au nord et quasiment absente au sud [14].

*Marrubium vulgare* est une plante herbacée vivace, couverte d'un duvet blanc, à tiges dures, cotonneuse, quadrangulaire, rameuse, peu ou pas ramifiée, elle est velue et grisâtre. Dressées, portant souvent de nombreuses pousses courtes et stériles, de 40 à 60 cm de long.

Les feuilles sont recouvertes de poils blancs, fins et d'aspect laineux, ovales, arrondies, souvent un peu cordées à la base, feutrées à la face intérieure. Il possède de petites fleurs blanches de 12 à 15 mm de long, une corolle à deux lèvres dont l'inférieure est trilobée et la supérieure dilobée ainsi qu'un calice à 10 dents courtes et crochues [15-17].

Le fruit est un tétra-akène. Toute la plante dégage une odeur forte, sa saveur est âcre (qui irrite les organes du goût et de l'odorat) et amère [18].



Figure I.2 : l'espèce *Marrubium vulgare* L.



Figure I.3 : la plante *Marrubium vulgare* L [19].

### I.2.1. Classification botanique

Selon [20-22], la position systématique de *Marrubium vulgare L.* est indiquée dans le tableau (I.1) :

**Tableau (I.1) :** classification botanique de *Marrubium vulgare L.*

|                      |                            |
|----------------------|----------------------------|
| <b>Règne</b>         | <b>Plantae</b>             |
| <b>Sous-règne</b>    | Tracheobionta              |
| <b>Embranchement</b> | Spermatophytes             |
| <b>Division</b>      | Magnoliophytes             |
| <b>Classe</b>        | Magnolipsides              |
| <b>Sous-classe</b>   | Astérides                  |
| <b>Ordre</b>         | Lamiales                   |
| <b>Famille</b>       | Lamiacées                  |
| <b>Genre</b>         | <i>Marrubium</i>           |
| <b>Espèce</b>        | <i>Marrubium vulgare</i>   |
| <b>Nom binomiale</b> | <i>Marrubium vulgare L</i> |

### I.2.2. Appellation internationale

Le Marrube est composé de deux mots hébreux : Mar, rob, suc amer [23].

Elle est connue avec plusieurs noms régionaux dans différentes parties du monde comme présent le tableau ci-dessous :

**Tableau (I.2) :** Différentes appellations de *Marrubium vulgare* en plusieurs langues [24,25].

| Langue   | Appellation  |
|----------|--|
| Arabe    | <b>En Algérie :</b> Marioutte<br><b>En Tunisie :</b> Marroubia<br><b>En Egypte :</b> Alfarrasiyoun |
| Français | Marrube blanc, herbe vierge  |
| Anglais  | White horehound  |
| Allemand | Mauerandron, Weisse, Andron  |
| Grec     | Faracin, Berson  |
| Roumaine | Madroptim  |
| Indien   | Faracim, Shafar, shevir  |

### I.2.3. Culture

Est une plante qui se cultive facilement. Plus particulièrement sur un sol pauvre, sec, alcalin et calcaire dont le pH est entre 4,5 et 8,3. Elle nécessite une forte exposition au soleil. La propagation peut se faire par semis au printemps, bouturage ou en divisant les racines (c'est la méthode qui est la plus utilisée). *M. vulgare* fleurit généralement au début du printemps, facilement visité par les abeilles pour le nectar. Les feuilles et les sommités fleuries sont récoltées lors de la phase de floraison entre juin et septembre et utilisées fraîches ou séchées [25-27].

### I.2.4. Utilisation des *Marrubium vulgare* L. dans la pharmacopée traditionnelle

Connu depuis la plus haute antiquité, est utilisée par la médecine traditionnelle pour le traitement de différents types de pathologies humaines, en particulier celles liées aux processus respiratoires, inflammatoires, douloureux, et celles de diabète sucré [27,28].

Les Egyptiens et les Romains l'utilisèrent, comme principal ingrédient, dans un antidote des poisons végétaux. Elle était déjà considérée comme un traitement spécifique des affections de l'appareil respiratoire dans l'Egypte et la Grèce anciennes. Il était censé faciliter la digestion, détruire les vers intestinaux et les brûlures d'estomac. Le Moyen Age, qui l'employait couramment dans le traitement des mêmes maux, l'a de surcroit reconnu tonique, cholagogue et diurétique. Une infusion de marrube blanc pulvérisé sur les arbres fruitiers qui aident à tuer les chancres. Elle est considérée comme « l'une des meilleures plantes d'Europe » [8,29].

En Afrique du Nord et en Algérie, il est utilisé en perfusion pour la thérapie antihypertensive, en tant qu'expectorant, en thérapie antispasmodique pour la bronchite aiguë ou chronique, la toux et le rhume et en cas d'asthme, de perte d'appétit et de dyspepsie [28,30].

En Allemagne, le marrube blanc est utilisé comme remède amer et pour traiter les troubles dyspeptiques tels que la sensation de réplétion, les flatulences et la perte d'appétit. Il est également utilisé pour le catarrhe des voies respiratoires en tant que composant de certains médicaments antitussifs et expectorants [20,25].

Elle est traditionnellement utilisée dans diverses parties de l'Europe, la France, le Pakistan, le Brésil, la Tunisie et le Maroc pour le traitement de la bronchite aiguë et chronique, le catarrhe pulmonaire, les infections respiratoires, la tuberculose, l'asthme et la jaunisse et à l'extérieur, pour les lésions cutanées et les ulcères [27].

En médecine traditionnelles Iranienne, le marrube est utilisé dans le traitement de l'estomac, de l'arythmie, de l'asthme, de l'ictère, des maladies pulmonaires et des troubles hépatiques [25].

Le marronnier blanc est traditionnellement utilisé pour préparer du thé et des bonbons à Norfolk et dans d'autres régions de l'Angleterre [8].

### I.2.5. Pharmacologie de la plante

Plusieurs études expérimentales ont confirmé le potentiel thérapeutique de cette plante, ainsi que l'isolement et l'identification de nombreux principes actifs différents faisant de cette plante une source importante d'agents phytothérapeutiques potentiels qui possèdent de nombreuses activités qui sont utilisées comme antioxydant, analgésique, antioedematogénique, trouble neurologique, hypoglycémiant, antipyrétique, diurétique, antitussif, anti-inflammatoire, emménagogue, sédatif cardiaque, apéritif, antidiabétique, résolutif, stomachique, fortement tonique [5,27,31,32].

Jus et infusion de *M. vulgare* utilisés en interne comme stimulant de la sécrétion gastrique en raison de la présence d'ingrédients amers, en particulier l'acide marrubinique en tant qu'agent cholérétique [21].

La macération est utilisée pour les enfants atteints de bronchite aiguë dispose ainsi de sa boisson quotidienne sans que l'on ait besoin de filtrer. Ce macérat décongestionne les muqueuses, fluidifie les sécrétions bronchiques et modifie leur aspect [30].

La pâte de feuilles est appliquée pour les furoncles et les rhumatismes. L'infusion d'herbes séchées est utilisée pour la débilité et hypertension artérielle. Les feuilles, les fleurs et l'infusion de la tige sont utilisées comme gastrique pour le diabète et les problèmes cardiaques.

La tige florifère sèche à des effets irritants sur la muqueuse. En herboristerie, il est utilisé pour les douleurs menstruelles et les irrégularités menstruelles. Il est également utilisé en externe pour traiter les plaies douloureuses et enflammées. En raison de la présence de composants volatils, il est utilisé en perfusion en une ou deux doses, comme stimulant, résolvant, anthelminthique, dyspepsie, aménorrhée, rhumatisme chronique et dans l'hépatite [21,33].

L'effet stimulant de l'appétit de *M. vulgare* passe par l'activation des récepteurs amers [18]. L'extrait brut de *Marrubium vulgare* est largement utilisé comme traitement antihypertenseur en médecine traditionnelle [34].

L'extrait aqueux de *M. vulgare* a montré une activité antidiabétique et des effets sur les propriétés de poids corporel [25].

L'huile essentielle extraite par distillation de cette plante aromatique est appréciée pour leur efficacité bioactive en tant qu'antifongique, antibactérien, antioxydant et autres activités biologiques [25].

### I.2.6. Composition chimique du *Marrubium vulgare* L

Des études phytochimiques antérieures ont montré la présence des diterpènes amers de la série des furanolabdanes, d'alcaloïdes, de lactones, d'hétérosides flavoniques, de stéroïdes, de flavonoïdes, de tanins, et d'esters phénylpropanoïdes chez *M. vulgare*.

Elle contient plusieurs composants utiles biologiquement actifs. Son composant le plus connu est la marrubine et son précurseur préfuranique la prémarrubiine; *apigénine*, *apigénine 7-O-glucoside*, *apigénine 7-lactate*, *apigénine 7- (6''-p-coumaroyl) -glucoside*, *lutéoline*, *lutéoline 7-O-β-D-glucoside*, *lutéoline 7-lactate*, *chrysoeriol*, *chrysoeriol O -glucuronide*, *quercétine 3-O-α-L-rhamnosil-glucoside*, *isoquercitrine*, *acide ursolique*, *acide gallique*, *acide caféique*, *caféol maléique*, *vulgarol*, *vulgarine*, *β-sitostérol*, *stigmastérol*, *vitexine*, *acteoside*, *forsythoside B*, *arénideside*, *ballotetroside*, *marruboside*, *acéthyl marruboside*, *marrubénol*, *marrubiol*, *acide 6-octadécynoïque*, *acide 5-O-caféoylquinique* (chlorogénique); *ladaneine*, *11-oxomarrubine*, *vulgarcoside A*, *3-hydroxyapigénine-4'-O- (6''-O-p-coumaroyl) -bêta-D-glucopyranoside*, esters *phénylpropanoïdes* et la présence d'une faible quantité d'huiles essentielles comportant différents composés sesqui et monoterpéniques (moins de 1%) soit *l'α-pinène*, *le camphène*, *le limonène*.

En outre il y a des pyrrolidine alcaloïdes – stachines. Aussi des lactoylflavones, et quelques dérivés de l'acide ursolique et la vitamine C [25, 27, 33, 35,36].

### I.2.7. Propriété biologique

#### I.2.7.1. Propriété antioxydante

L'huile essentielle et l'extrait obtenu à partir des parties aériennes de *Marrubium vulgare* se sont avérés avoir de fortes activités antimicrobiennes et antioxydantes.

Certaines études ont démontré que l'activité antioxydante considérable de *M. vulgare* est associée à la présence de *marrubine* ainsi que de composés phénoliques et de flavonoïdes exerçant un effet synergique, en plus un effet antioxydante, anticoagulant, antiplaquettaire et anti-inflammatoire important a été attribué à la *marrubine* [25,34].

#### I.2.7.2. Propriété antimicrobienne

Le pouvoir antimicrobien de *M. vulgare* est dû essentiellement à ces principes actifs tels que les huiles essentielles, les flavonoïdes et les tanins [37].

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles de la partie aérienne de *M. vulgare* sont soupçonnées d'être associées, en partie avec leur forte teneur en composés oxygénés.

Globalement, une telle activité antimicrobienne pourrait être principalement en raison de la présence de *1,8-cinéole*, de *camphre* et de *linalol*, qui sont bien connus pour leurs activités antibactériennes, ou de la présence de  *$\beta$ -caryophyllène* pour lequel une activité antimicrobienne est décrite, et la présence des monoterpènes oxygénés, qui sont particulièrement actifs contre les cellules microbiennes. De plus, le *germacrene-D* est connu avoir un effet important sur le comportement des insectes et à l'activité antibactériennes et antifongiques importants. En fait, ces composés sont partiellement solubles dans les milieux aqueux et causer plusieurs dommages tels que troubles morphologiques de l'hypha mycélium et rupture de la membrane plasmique.

Quelques autres études ont conclu que l'huile essentielle entière a une plus grande activité antimicrobienne que les principaux composants mixtes, ce qui suggère que les composants mineurs sont essentiels à l'activité et peuvent avoir une synergie effet ou influence potentielle sur l'huile essentielle [38,39].

Le tableau (I.3) résume les principales activités biologiques proposées pour *Marrubium vulgare*.

Tableau (I.3) : Principales actions biologiques proposées pour *Marrubium vulgare* L [40].

| Actions pharmacologiques              | Composés pharmacologiques   | Mécanismes impliqués  |
|---------------------------------------|---|---|
| <b>Anti-inflammatoire</b>             | -Esters<br>Phénylpropanoïdes<br>Glycosylés<br>-Marrubin               | -Inhibition de la COX-2.<br><br>-Stabilisation de la membrane des mastocytes.<br>-Modulation des récepteur $\beta$ -2.  |
| <b>Analgésique</b>                    | -Marrubin et composés liés à la structure                             | -Inhibition de la COX-2.<br>-Action nociceptive centrale et $\mu$ -opioïde.<br>-Mécanisme antinociceptif périphériques indépendant du récepteur.  |
| <b>Antispasmodique / vasorelaxant</b> | -Flavonoïdes<br><br>-Marrubénol et composés apparentés à la structure | -Interférence sur l'absorption des ions $Ca^{2+}$ dans le cytoplasme ou pendant la libération des organites intracellulaires.<br>-Blocus sélectif des canaux $Ca^{2+}$ de type L dans les muscles lisses intestinaux. |
| <b>Gastro-protecteur</b>              | -Marrubin   | -Inhibition de la COX-2.<br>-Le NO et le mucus ont augmenté la production et un pH gastrique plus élevé.  |
| <b>Hépatoprotective</b>               | -Polyphénols et autres antioxydants                                   | -Rupture des hépatocytes inférieurs.  |
| <b>Antidiabétique</b>                 | _____   | -Agonistes des récepteurs TAS2<br>-Des niveaux d'insuline plus élevé.   |
| <b>Hypo-cholestérol</b>               | -Acide mic-6-octadécénoïque   | -Cholestérol total inférieur, cholestérol LDL Fraction et triglycérides plasmatiques.<br>Fraction HDL cholestérol plus élevé.   |
| <b>Antihypertenseur</b>               | -Marrubénol et composés apparentés à la structure                     | -Blocus sélectif des canaux $Ca^{2+}$ de type L   |

**Tableau (I.3) (suite) :** Principales actions biologiques proposées pour *Marrubium vulgare* L [40].

| <b>Actions pharmacologiques</b>     | <b>Composés pharmacologiques</b>               | <b>Mécanismes impliqués</b>   |
|-------------------------------------|--|---|
| <b>Antioxydant</b>                  | -Composés phénoliques                          | -Chélatant l'effet des ions des ions $\text{Cu}^{2+}$ libre empêche la catalyse oxydative.<br>-Diminution de la production des intermédiaires réactifs.     |
| <b>Antimicrobien / antifongique</b> | -Composés phénoliques<br><br>-Tanins condensés | -Action sur la membrane cellulaire de Gram+ et Gram-<br><br>-Viabilité réduite des micro-organismes infectieux.   |
| <b>Antiasthmatique</b>              | -Flavonoïdes                                   | -Stabilisation de la membrane des macrophages.  |
| <b>Neuroprotection</b>              | _____  | Inhibition de l'acétylcholinestérase et de butylcholinestérase.   |
| <b>Cardioprotectrice</b>            | -marrubénol et les esters phénylpropanoïdes    | -Blocage des canaux calciques de type L et d'inhibiteurs de la cyclooxygénase (COX).<br>-Protection des cardiomyocytes contre la mort induite par l'hypoxie |
| <b>Antihypertenseur</b>             | _____  | -Inhibition de la contraction induite par le KCl dans l'aorte.  |

### I.2.8. Formes d'utilisations et posologies

L'EMA a soutenu son utilisation traditionnelle comme expectorant dans les catarrhes associés à un refroidissement d'une durée n'excédant pas 7 jours et dans le traitement des symptômes de dyspepsie tels que gonflement ou flatulence et perte temporaire d'appétit pendant un maximum de 2 semaines. Pour sa part, la commission allemande E a indiqué son utilisation dans le traitement de l'anorexie, dans les troubles dyspeptiques tels que les flatulences et la sensation de satiété dans le catarrhe des voies respiratoires supérieures [40].

L'administration orale est la seule voie d'administration des préparations herbacées du marrube blanc dans les indications traditionnelles abordées dans les présents rapports d'évaluations [41].

L'indication thérapeutique et les dosages du médicament M. vulgare sont décrits dans le tableau. Il est conseillé de n'en abuser le traitement [30,40].

**Tableau (I.4) :** Indications thérapeutiques et proposition de dosage pour la partie aérienne de *Marrubium vulgare* L. reconnues par l'EMA et la Commission allemande E [40,42].

| Indication thérapeutique  | Posologie proposée   |  |
|---|--|--|
|   | EMA  | Commission allemande E   |
| <b>Expectorant dans le catarrhe associé au refroidissement</b>  | -Plante coupée : 1-2g/250 ml eau bouillante/tid<br>-Teinture : 7,5 ml/tid  | -Dose quotidienne : 4 à 5 g de matériel végétal frais / séché ou dose équivalente                        |
| <b>Symptômes de dyspepsie tels que gonflement ou flatulence</b> | -Poudre (1 gélule) : 225-445 mg/tid<br>-Extrait sec (2 gélules) : 4,5g /jour   | -L'administration doit être séparée pour les repas et les autres médicaments pendant au moins 30 minutes |
| <b>Perte d'appétit temporaire</b>                               | -Jus : 10-20 ml/tid<br>-Extrait éthanol/eau (30/70) préparé à partir de plante séchée : 1,5-4 ml/tid<br><br>L'administration doit être séparée pour les repas et les autres médicaments pendant au moins 30 minutes<br><br>UE. Ph. Nécessite une teneur minimale de 0,7% de marrubine (médicament séché) |  |

**I.2.9. Toxicité :**

Selon la commission européenne c'est une plante amère à caractère salin et ne peut donc pas être toléré s'il y a une gastroentérite ou des situations de nausées ou de vomissements ou encore en cas de dyspepsie [18].

Des études in vivo sur des rats n'ont montré aucune toxicité aiguë pour un extrait sec (2000 mg / kg) de *M. vulgare* obtenu par macération au méthanol (1,5 kg de partie arienne/ 4 L). Aucun changement dans la peau ou les yeux et la muqueuse nasale n'a été observé. Dans un autre essai in vivo, une dose unique d'un extrait sec (1 g / kg de poids corporel, préparé à 1 g d'herbe séchée / 50 ml d'eau distillée) a été administrée par voie orale à des souris. Les animaux ont été surveillés pendant 7 jours sans changement notable de poids ou de comportement. Seule une légère tachycardie a été détectée 1 h après l'ingestion. Après les huit jours, aucun changement anatomique ou histologique suggérant des effets toxiques ou mutagènes n'a été trouvé. Aucun essai adéquat de tératogénicité n'a été publié [40].

**I.2.10. Effet indésirable et contre-indication**

Aucun évènement indésirable n'a été signalé. Selon la Commission Européenne, la plante stimulerait l'utérus et pourrait avoir un effet abortif, il est donc recommandé aux femmes enceintes d'éviter le marrube blanc. Une autre étude à montrer que le jus de plante peut provoquer une dermatite [28,40].

***Chapitre II :***  
***Les métabolites secondaires***

## **II.1. Les substances naturelles**

Les substances naturelles issues de la biomasse des végétaux représentent des produits de grande valeur au diffèrent secteurs. Ils sont utilisés comme des produits chimiques tels que les médicaments, les arômes, les parfums, les insecticides, les colorants, etc. Parmi ces composés on retrouve une grande partie des métabolites secondaires qui se sont illustrés en thérapie.

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions, ces plantes sont riches en une grande variété de métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les terpènes, les alcaloïdes, les saponines, les tanins ... etc., qui sont produits à partir de métabolites primaires tels que les acides aminés ou l'acétyl coenzyme A (acétyl-CoA). Ces composés sont largement utilisés pour la synthèse des substances aromatiques et le développement de médicament comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydant et anti-radicalaires [43-45].

## **II.2. Les métabolites secondaires**

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées à partir des métabolites primaires et accumulées en petites quantités dans les plantes autotrophes [46].

### **II.2.1. Les composés phénoliques**

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques. Ces composés sont caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie de molécules simples (acides phénoliques simples) aux molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) [47,48].

Les composés phénoliques jouent un rôle dans la protection contre les pathogènes et les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations ultraviolettes. L'astringence et l'amertume des aliments et des boissons dépendent de la teneur en polyphénols [14].

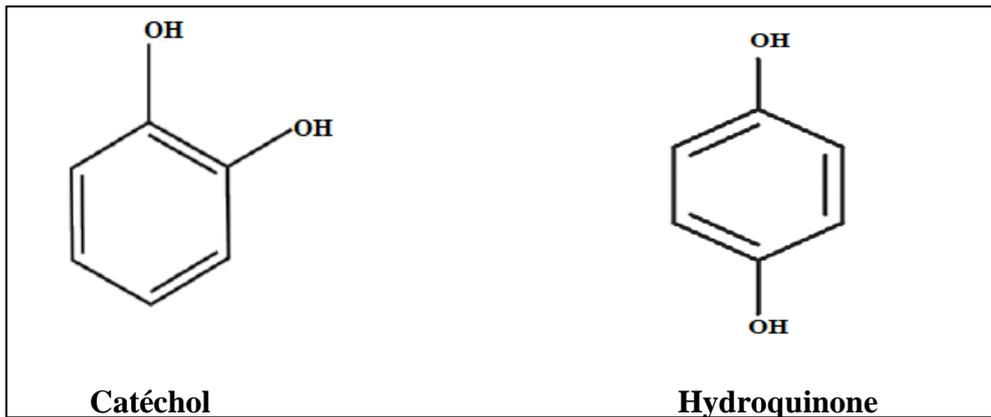


Figure II.1: Structures chimiques de quelques composés phénoliques [49].

### II.2.2. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont largement répandus chez les plantes. Ils dérivent principalement de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique et comportent un radical COOH. Ils se trouvent souvent sous la forme de glycosides ou d'esters [50].

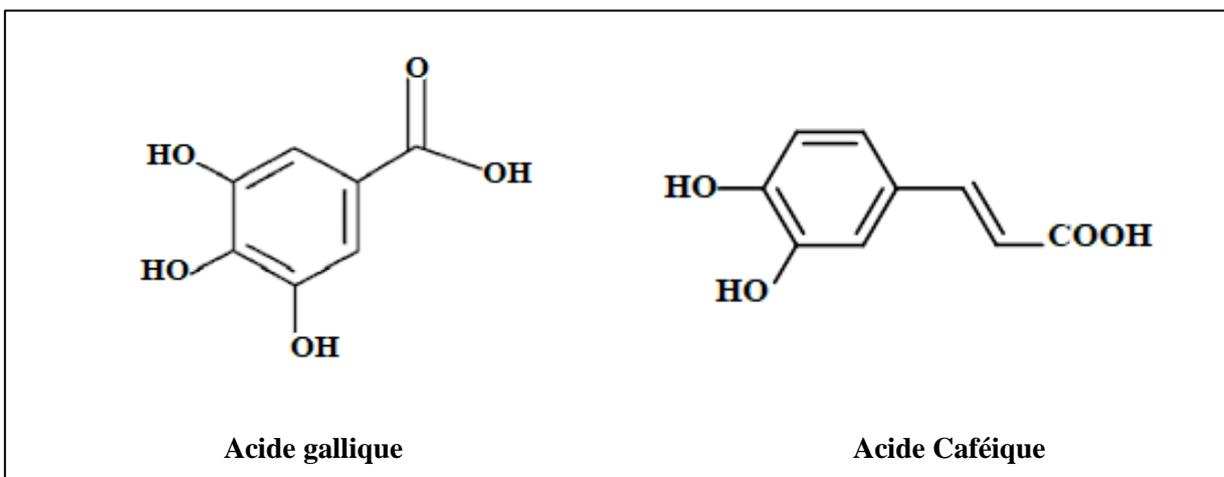


Figure II.2 : Structures chimiques de quelques acides phénoliques [51].

### II.2.3. Les flavonoïdes

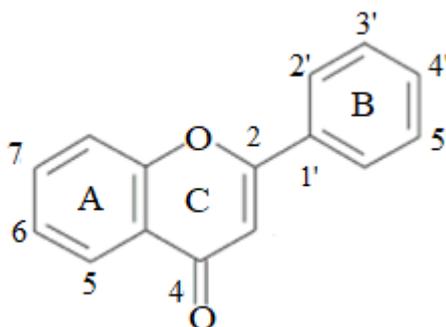
Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [52].

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le thé et le café. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculo-protectrices, anti-hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives [52].

Les flavonoïdes sont retrouvés également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant des flavonoïdes ont été (et sont) utilisés en médecine traditionnelle de par le monde [52].

#### II.2.3.1. Structure de flavonoïdes

Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- $\gamma$ -pyrone. [52]



**Figure II.3:** Structures de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone [52].

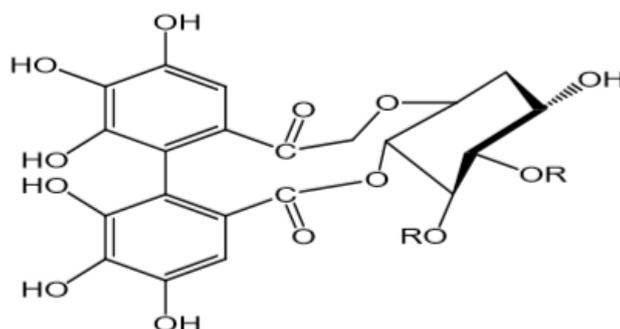
## II.2.4. Les tanins

Les tanins constituent un groupe hétérogène de composés polyphénoliques, présents dans un nombre considérable d'aliments végétaux. Le terme tanin est dérivé des propriétés de ces composés d'interagir et de précipiter les macromolécules, telles que les protéines, qui les rendent capables de bronzer le cuir animal. Par la suite, une définition générale des tanins a émergé, les désignant comme des polyphénols de haut poids moléculaire qui précipitent les protéines de la solution [53].

### II.2.4.1. Classification des tanins

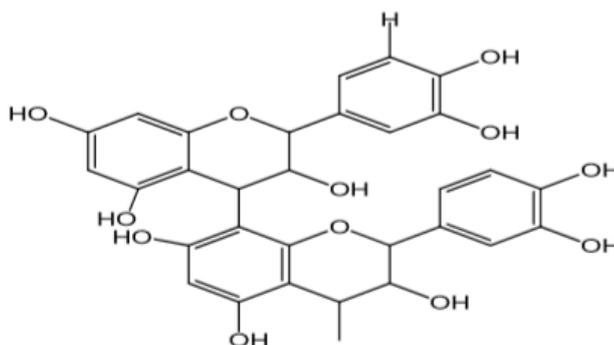
Les tanins sont classés en deux grands groupes :

- **Tanins hydrolysables** : consistant en un noyau central de glucides auquel les acides carboxyliques phénoliques sont liés par une liaison ester.



**Figure II.4:** structure chimique des tanins hydrolysables [54].

- **Tanins condensés** : ou proanthocyanidines, constitués d'oligomères de deux ou plusieurs flavan-3-ols, tels que la catéchine, l'épicatéchine ou la gallocatéchine correspondante.



**Figure II.5 :** structure chimique des tanins condensés [48].

#### **II.2.4.2. Propriétés biologiques des tanins**

Les tanins ont une affinité très élevée pour les protéines et forment des complexes protéine-tanin. L'ingestion d'une plante contenant des tanins condensés diminue l'utilisation des nutriments, les protéines étant affectées dans une large mesure et la consommation alimentaire. En revanche, les tanins hydrolysables sont potentiellement toxiques pour les animaux. La consommation d'aliments contenant des niveaux élevés de tanins hydrolysables provoque une toxicité hépatique et rénale et conduit à la mort des animaux. Les empoisonnements au chêne et au bois jaune sont attribués aux tanins hydrolysables [55].

#### **II.2.5. Les alcaloïdes**

Il existe plus de 12.000 composés connus des alcaloïdes. Ils sont des substances organiques d'origine végétale, azotée et à caractère alcalin [44,56].

##### **II.2.5.1. Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes**

Chimiquement, les alcaloïdes sont un groupe très hétérogène. Les alcaloïdes oxygénés sont solides, cristallisables et peu volatils. Ceux sans oxygène peuvent prendre la forme de liquide, de liquide huileux ou de solides cristallisables. La plupart sont incolores, peu solubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques. Bien sûr, le sel est plus soluble dans l'alcool et l'eau. Les alcaloïdes naturels sont levorotatoires, mais l'ajout de sodium ou un chauffage prolongé peut induire des variations dans leur sens de déviation de la lumière polarisée fine jusqu'à ce qu'ils deviennent optiquement inactifs [55,57].

##### **II.2.5.2. Propriétés pharmacologiques des alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont souvent toxiques pour l'homme, et beaucoup ont des activités physiologiques et neurologiques spectaculaires, qui sont utilisés en médecine généralement sous forme de sels. Certains exemples comprennent la vinblastine qui a des propriétés antitumorales. Quinine qui a des antipyrétiques et des propriétés antimicrobiennes ; et réserpine qui peut être utilisé pour traiter l'hypertension artérielle. Les alcaloïdes sont considérés comme des matières de réserve pour la synthèse des protéines, et comme des stimulants ou des régulateurs végétaux ou simplement comme des produits de détoxification.

Les alcaloïdes actuellement en usage clinique comprennent les analgésiques morphine et codéine, l'agent anticancéreux vinblastine, la colchicine suppresseur de goutte, le myorelaxant tubocurarine, l'ajmalicine antiarythmique, l'antibiotique sanguinarine, et la scopolamine sédatrice [44,55].

La figure suivante présente la structure de la morphine tel que :

A : cycle phénolique, B : cycle cyclohexane, C : cycle cyclohexénol, D : cycle N-méthyl-pipéridine et E : cycle furane partiellement saturé.

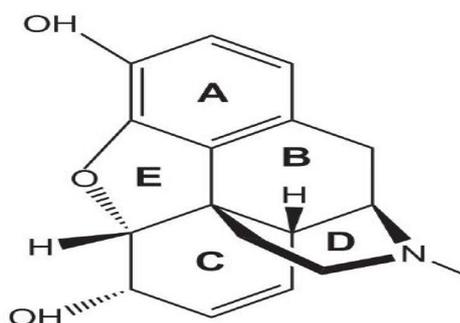
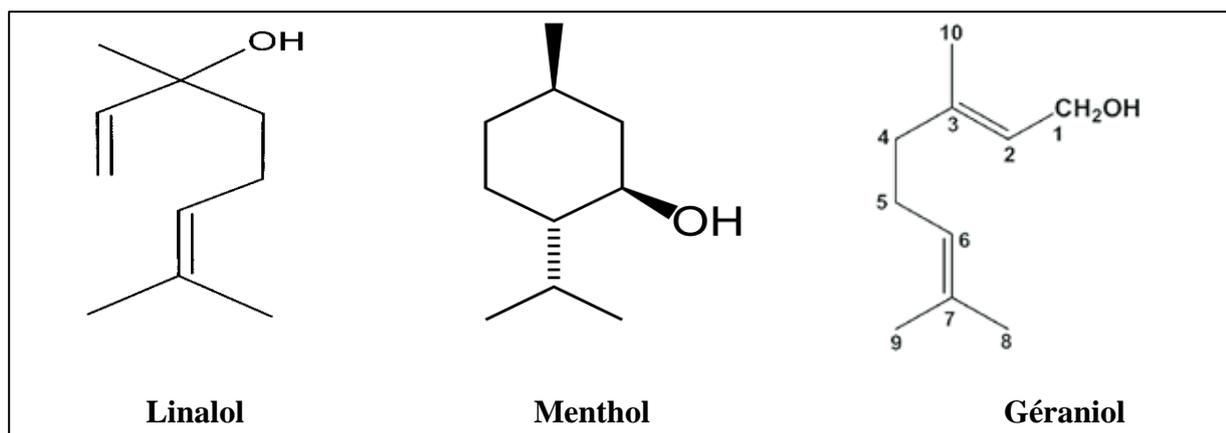


Figure II.6 : structure chimique de la morphine [58].

### II.2.6. Les terpènes

Les terpènes sont des composés moins volatils, fortement amers et toxiques qui protègent les plantes contre la consommation des animaux. Leur structure de base est l'unité d'isoprène  $(C_5)_n$ , qui forme le squelette carboné des terpènes. Ils se présentent principalement dans la nature sous forme d'hydrocarbures, d'alcools et de leurs glycosides, éthers, aldéhydes, cétones, acides carboxyliques et esters.

Les plantes produisent les terpènes afin d'attirer des insectes spécifiques pour la pollinisation ou d'expulser certains animaux qui utilisent les plantes comme nourriture. Ils sont considérés comme des composés de signal et régulateurs de croissance [45].



**Figure II.7 :** Structures chimiques de quelques composés à base des terpènes [45,59].

### II.2.6.1. Propriétés biologiques des terpènes

Les terpènes jouent un rôle important en tant que parfums en parfumerie, en tant que constituants d'arômes pour épicer les aliments, en tant que composés de leurre respectueux de l'environnement pour piéger les insectes nuisibles avec les imitations de leurs propres phénomènes. Ils ont des propriétés antioxydants. Ces composés sont utilisés en thérapeutique comme agents anti-tumeurs, antibactériens, antifongiques, antiviraux, antiprotozoïques, anti-inflammatoires, anti-parasitaires, etc.... [45,60]

### II.2.6.2. Classification des terpènes

Les terpènes sont classés selon le nombre de ces unités d'isoprène  $C_5$  qu'ils contiennent comme suit [45] :

- ✓ Monoterpénoïdes  $C_{10}$
- ✓ Sesquiterpénoïdes  $C_{15}$
- ✓ Diterpénoïdes  $C_{20}$
- ✓ Sesterterpénoïdes  $C_{25}$
- ✓ Triterpénoïdes  $C_{30}$
- ✓ Caroténoïdes  $C_{40}$
- ✓ Polyterpénoïdes  $C(5)_n$



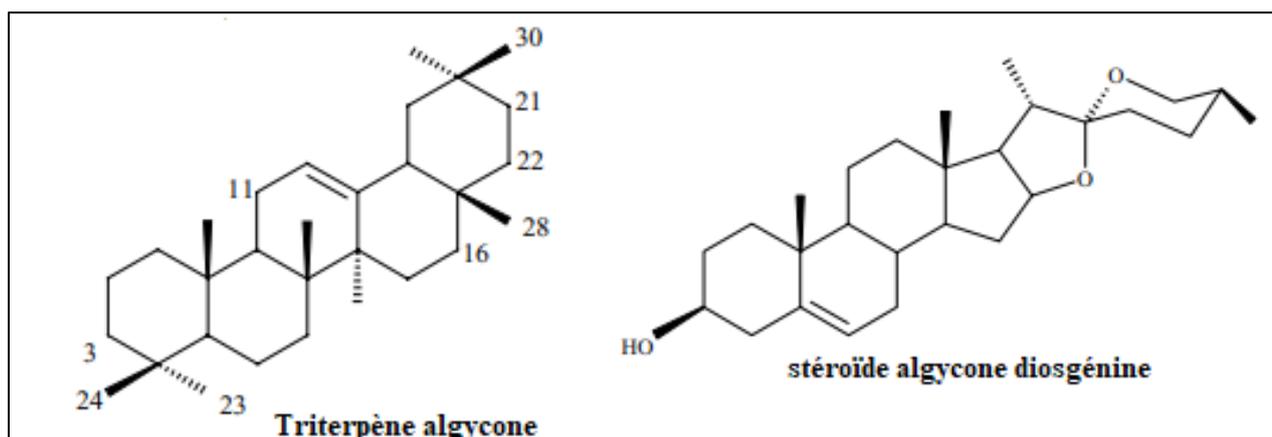


Figure II.9: Structures chimiques de quelques saponines [62].

### II.2.7.1. Propriétés pharmacologiques des saponines

Les saponines possèdent une action expectorante et antitussive. Administrées à petites doses, les saponines stimulent la sécrétion de mucus liquide facilitant ainsi l'expectoration. Cet effet est dû à une irritation de la muqueuse gastrique qui par action réflexe provoque une augmentation de la sécrétion bronchique [55]. Il a également été démontré que les saponines inhibent diverses enzymes digestives, dont la trypsine et la chymotrypsine, et sont également connues pour inhiber la dégradation des protéines en formant des complexes saponine-protéine [57].

Après administration, les saponines entrent en contact avec le mucus et leur capacité à réduire la tension superficielle rend le mucus plus fluide et plus facile à éliminer. Cet effet irritant est dans certains cas exploité pour favoriser l'absorption d'autres médicaments (effet synergique). Si elle est administrée à des doses plus élevées, les saponines peuvent induire des effets purgatifs. Dans l'industrie des cosmétiques, ils sont employés comme agents émulsifiants dans la préparation de mousse [57].

### **II.3. Méthodes d'extraction des composés phénoliques**

#### **II.3.1. Extraction au Soxhlet**

L'extraction au Soxhlet représente la méthode de référence pour l'extraction des métabolites secondaires des plantes. Le principe repose sur la réalisation d'une série d'extractions solide-liquide de manière continue à l'aide de solvant chaud, dont la température est légèrement inférieure à la température d'ébullition [63]. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol, moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone [64].

À chaque cycle, du solvant frais, exempt de métabolites, entre en contact avec la plante afin de les extraire. L'extraction s'effectue jusqu'à ce que la totalité des métabolites soit extraite et se retrouve dans le solvant. L'utilisation du chauffe-ballon permet de porter le solvant d'extraction à ébullition et les vapeurs de solvant montent vers le réfrigérant, via le coude extérieur de l'extracteur Soxhlet. Ces vapeurs sont ensuite condensées au contact du réfrigérant et le solvant liquide tombe dans le corps de l'extracteur où se situe la cartouche. Les métabolites secondaires sont alors solubilisés dans le solvant en fonction de leur affinité avec celui-ci [63].

#### **II.3.2. Extraction par macération**

La macération est une méthode courante pour l'extraction de petites quantités de matière végétale en laboratoire car elle peut être effectuée de manière pratique dans des flacons Erlenmeyer (les flacons peuvent être recouverts de parafilm ou d'une feuille d'aluminium pour empêcher l'évaporation du solvant [65]).

Dans ce procédé, la plante entière ou grossièrement en poudre est placée dans un récipient bouché avec le solvant et laissé au repos à température ambiante pendant une période d'au moins 3 jours avec une agitation fréquente jusqu'à ce que la matière soluble se soit dissoute. Le mélange est ensuite filtré, le marc (le matériau solide humide) est pressé et les liquides combinés sont clarifiés par filtration ou décantation après repos [66].

Les grands échantillons peuvent également être macérés, généralement dans un grand récipient avec un robinet à la base [65].

### **II.3.3. Extraction par décoction**

La décoction est une procédure d'extraction qui a été utilisée en particulier pour les constituants hydrosolubles et thermostables. Dans ce cas, la plante brute est bouillie dans un extracteur de type ouvert qui contient un volume spécifié d'eau et le processus dure pendant une période de temps spécifique. Habituellement, le rapport massique initial de l'échantillon de médicament brut à l'eau est de un à quatre (1: 4) ou de un à seize (1:16). Le volume est ensuite ramené à un quart de son volume d'origine en raison de l'ébullition et de l'évaporation qui ont lieu pendant la procédure d'extraction. Lorsque l'extraction avec décoction est terminée, l'extrait concentré est filtré et utilisé tel quel ou après un traitement ultérieur [66].

### **II.4. Les essences ou huiles essentielles**

Les essences ou huiles essentielles, connues également sous le nom d'huiles volatiles, de parfums, etc. S'obtient à partir d'une matière première végétale (plante ou arbre aromatique) par entraînement à la vapeur, procédé mécanique ou distillation à sec. Ils sont des substances odorantes, huileuse, volatiles, peu solubles dans l'eau, plus ou moins solubles dans l'alcool et dans l'éther, incolores ou jaunâtres, inflammables, s'altérant facilement à l'air en se résinifiant. Elles sont liquides à la température ordinaire, quelques-unes sont solides ou en partie cristallisées ; elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes dont elles se distinguent par leur volatilité, leur odeur plus ou moins forte, suave, piquante ou désagréable, et par la propriété qu'elles ont de ne pas laisser de tache durable sur le papier [7,67].

Une huile essentielle est définie selon la Pharmacopée Européenne comme : « Un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie par distillation à la vapeur, distillation sèche ou procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » [68].

Selon AFNOR : « Ce sont des produits généralement odorants, obtenus soit par entraînement à la vapeur d'eau, de végétaux ou de parties de végétaux, soit par expression du péricarpe frais de certains citrus » [69].

### II.4.1. Composition et biochimie des huiles essentielles

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe et soumise à de très nombreuses variables appartenant à différentes classes chimiques [70]. Les monoterpènes et les sesquiterpènes dérivés des voies de l'acide mévalonique (MVA) ou du phosphate de méthoxytritol (MEP) sont généralement le principal groupe de composés que l'on trouve dans les huiles essentielles. En outre, les phénylpropanoïdes dérivés de la voie shikimate sont également très fréquents. Certaines huiles essentielles peuvent également contenir des acides gras et leurs esters et, plus rarement, les dérivés azotés et soufrés [71].

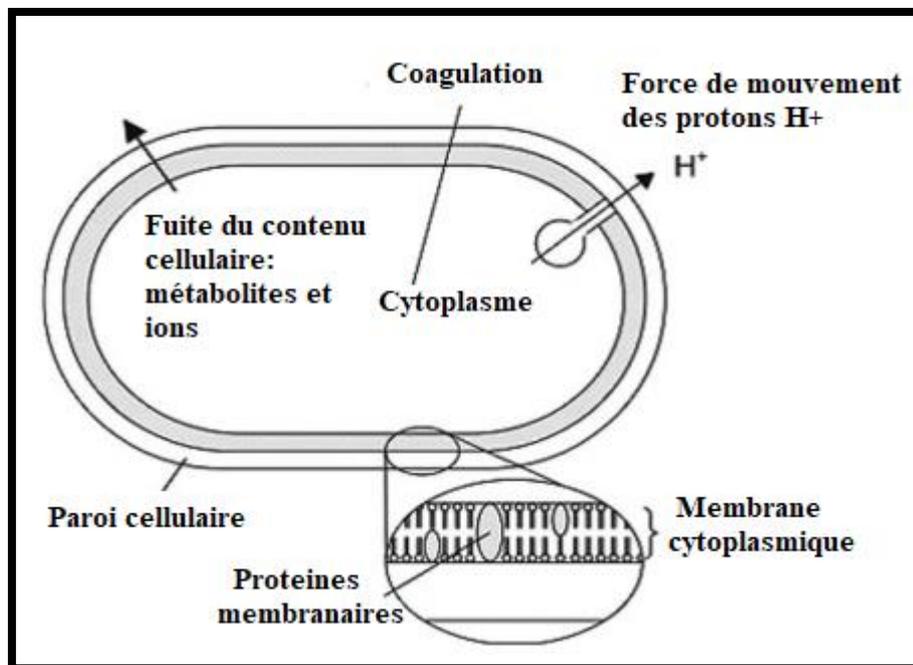
### II.4.2. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles [67,72]

- A la température de 15°C, toutes les essences sont liquides, ou au moins une partie. Elles sont très inflammables et brûlent avec une flamme fuligineuse. Leur degré de fluidité est évidemment variable. L'odeur des essences est particulièrement caractéristique.
- Les essences nouvellement distillées sont pour la plupart incolores ou jaunâtres. Leur saveur est le plus souvent forte et aromatique.
- Les essences fraîchement extraites ont généralement une odeur moins forte que celles qu'ont déjà subi pendant quelque temps sous l'action de l'oxygène de l'air. Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité. De ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée.
- La densité des huiles essentielles varie entre 0,8 et 1,2 : la plupart d'entre elles sont plus légères que l'eau avec une densité de 0,85 à 0,98.
- Elles ne sont pas miscibles avec l'eau et ne s'y dissolvent qu'en très faible proportion. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau.
- Tous les HE sont solubles dans l'éther, le chloroforme, le sulfure de carbone, l'éther de pétrole et dans l'alcool absolu.
- Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15).

### II.4.3. Mécanisme d'action des huiles essentielles

Bien que les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et de leurs composants aient été largement étudiées par le passé, le mécanisme d'action n'a pas été élucidé entièrement [73].

La structure chimique des constituants des HE conditionne leur mode précis d'action antibactérienne. Compte tenu du nombre de différents groupes de composés chimiques présents dans les HE, il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuée à un mécanisme spécifique mais qu'il y ait plusieurs cibles dans la cellule. Les principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles sont indiquées dans la figure (II.10) [73].



**Figure II.10 :** Principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles [73].

Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des huiles essentielles sont :

- ✓ L'altération de la paroi cellulaire ;
- ✓ La dégradation de la membrane cytoplasmique ;
- ✓ L'altération des protéines membranaires ;
- ✓ La fuite du contenu cellulaire ;

- ✓ La coagulation du cytoplasme ;
- ✓ L'épuisement de la force de mouvement des protons [73].

Une caractéristique importante des huiles essentielles et de leurs constituants est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permet de s'insérer dans les couches lipidiques de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries, perturbant les structures et les rendant plus perméables. La fuite des ions et autres constituants de la cellule peut alors se produire [73].

## II.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'extraction d'une l'huile essentielle (HE) est nécessairement une opération complexe et délicate. Elle a pour but, en effet, de capter et recueillir les produits les plus volatils, subtils et les plus fragiles qu'élabore le végétal, et cela sans en altérer la qualité [64].

L'extraction des HE de la matière végétale peut être réalisée au moyen de plusieurs procédés, basés sur des techniques anciennes ou récentes [64].

Parmi les méthodes d'extraction disponibles, seuls deux procédés permettent d'obtenir des huiles essentielles conformes avec la pharmacopée européenne. Il s'agit de l'expression à froid et de la distillation. Bien qu'elles n'aboutissent pas à des huiles essentielles au sens réglementaire, l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes et l'extraction en fluide supercritique sont deux méthodes d'extraction dont l'utilisation se généralise [68].

### II.5.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HE. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées dans l'essencier, avant d'être séparées en une phase aqueuse (HA) et une phase organique (HE). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques, évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile. De plus, le parfum de l'HE obtenue est plus délicat et la distillation, régulière et plus rapide, fait que les notes de tête sont riches en esters. Les fractions dites « de tête », fragrances très volatiles dues à des molécules légères, apparaissent en premier. Le plus souvent, une demi-heure permet de recueillir 95 % des molécules volatiles [64].

### **II.5.2. Extraction par Hydrodistillation**

Elle consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau et l'ensemble est porté à ébullition. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage des eaux aromatiques obtenues lors de la décantation.

Ce procédé présente des inconvénients dus principalement à l'action de la vapeur d'eau ou de l'eau à l'ébullition ; Certains organes végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation (HD) ce qui convient à des la modification de la couleur, de l'odeur et de la composition de l'huile essentielle au cours de la distillation.

La distillation produit des huiles aromatiques de moindre qualité principalement due à une présence importante d'aldéhydes, composés sensibles à l'oxydation et à la chaleur [64,74].

### **II.5.3. Méthode d'hydrodiffusion**

L'hydrodiffusion, est une Co-distillation descendante. Dans ce procédé, le végétal est disposé dans un parallélépipède métallique grillagé. On soumet donc le végétal à une pulsion de vapeur d'eau, saturée et humide, mais jamais surchauffée de haut en bas. La forme de l'appareillage permet une meilleure répartition des charges. La vapeur d'eau emporte avec elle toutes les substances volatiles. L'huile essentielle est recueillie grâce à un collecteur qui permet un équilibre avec la pression atmosphérique. On peut aussi préciser qu'il y a un procédé de cohobation qui renvoie dans la chaudière toutes les eaux qui sont séparées des huiles [75].

### **II.5.4. Expression à froid**

Il s'agit du procédé d'extraction le plus simple et le plus limité. La technique est réservée à l'extraction des essences volatiles contenues dans les péricarpes d'agrumes en déchirant ces dernières par un traitement mécanique. Elle consiste à rompre ou dilacérer les parois des sacs oléifères contenus dans le mésocarpe situé juste sous l'écorce du fruit, l'épicarpe, pour en recueillir le contenu qui n'a subi aucune modification chimique liée à des solvants ou à la vapeur d'eau [64,76-78].

### **II.5.5. Extraction assistée par micro-ondes**

L'avantage de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et d'incrémenter le rendement. Elle est basée sur la SFME, une combinaison originale des techniques de chauffage par micro-ondes et de distillation sèche. Elle consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur au sein d'un four micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant.

Le chauffage interne de l'eau contenue dans la plante permet d'en dilater ses cellules et conduit à la rupture des glandes et des réceptacles oléifères. L'HE ainsi libérée est évaporée avec l'eau de la plante [64].

### **II.5.6. Extraction par fluide à l'état supercritique**

L'originalité de la technique d'extraction par fluide supercritique, dite SFE, provient de l'utilisation de solvants dans leur état supercritique, c'est-à-dire dans des conditions de températures et de pressions où le solvant se trouve dans un état intermédiaire aux phases liquide et gazeuse et présente des propriétés physico-chimiques différentes, notamment un pouvoir de solvation accru. Si, en pratique, de nombreux solvants peuvent être employés, 90% des SFE sont réalisées avec le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), en raison de leur non toxicité, disponible à haute pureté et à faible prix, et il possède l'avantage d'être éliminé aisément de l'extrait.

L'extraction des huiles essentielles par le CO<sub>2</sub> supercritique fournit des huiles de très bonne qualité et en temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques [64,79].

### **II.5.7. L'enfleurage**

L'enfleurage est une technique qui date de l'Antiquité égyptienne. Elle consiste à déposer des plantes en particulier les organes fragiles (fleurs d'oranger, pétales de rose) sur une couche de graisse animale qui se sature en essence. On épuise ensuite le corps gras par l'alcool qui récupère les senteurs et qui sera ensuite évaporé sous vide [80,81].

L'enfleurage à chaud consiste à mélanger, dans une cuve chauffée, des végétaux à de l'huile ou de graisse animale qui se charge de l'odeur des plantes. Une fois cette opération terminée, les débris végétaux sont retirés. L'huile est filtrée. En refroidissant on obtient une huile parfumée ou une pommade odorante [7].

L'enfleurage à froid consiste à poser à température ambiante des matières odorantes sur de l'huile végétale ou de la graisse animale. Par contact, le corps gras capte progressivement les odeurs. Il reste alors à retirer les débris végétaux et à récupérer l'huile ou la graisse odorante. Une fois encore on obtient soit une huile parfumée soit une pommade [82].

Cette technique est actuellement abandonnée au profit de l'extraction par les solvants en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite [83].

## **II.6. Techniques d'analyses des huiles essentielles**

### **II.6.1. La chromatographie en phase gazeuse couplée par la spectrométrie de masse (GC-SM)**

La GC-SM est la technique analytique la plus omniprésente pour l'identification et la quantification des substances organiques dans des matrices complexes. Elle est indispensable dans les domaines des sciences de l'environnement, de la médecine, de la recherche médicale et biologique, de la santé et de la sécurité, de l'industrie des arômes et des parfums, de la sécurité alimentaire, de l'emballage et de bien d'autres.

Les échantillons à analyser par GC-SM sont dans une grande variété d'états, y compris des gaz contenant des composés organiques, des échantillons liquides qui peuvent être des solvants organiques ou de l'eau contenant des composés hautement volatils à semi-volatils et des solides dans lesquels des composés volatils ou semi-volatils sont incorporés. Cette technique permet de :

- ✓ La séparation et l'analyse de mélanges multi-composants tels que les huiles essentielles, les hydrocarbures et les solvants.
- ✓ Détermination des poids moléculaires et parfois des compositions élémentaires de composés organiques inconnus dans des mélanges complexes.

- ✓ Détermination structurale de composés organiques inconnus dans des mélanges complexes à la fois en faisant correspondre leurs spectres avec des spectres de référence et par une interprétation spectrale a priori Temps d'analyse.

En plus du temps de préparation des échantillons, le temps d'analyse instrumentale est généralement fixé par la durée de la chromatographie en phase gazeuse, généralement entre 20 et 100 min [69, 84, 85].

### II.6.2. Chromatographie en phase gazeuse CPG

La CPG est une méthode de séparation et d'analyse largement utilisée dans le domaine pharmaceutique et la recherche scientifique [68].

Le principe de fonctionnement de base du CPG implique la volatilisation de l'échantillon dans une entrée ou un injecteur chauffé d'un chromatographe en phase gazeuse, suivie de la séparation des composants du mélange dans une colonne spécialement préparée. Seuls les composés qui peuvent être vaporisés sans décomposition conviennent à l'analyse CPG. Ces composés comprennent la plupart des solvants et pesticides, de nombreux composants dans les arômes, les huiles essentielles, les carburants hydrocarbonés et de nombreux médicaments [85].

L'identification des substances peut être facilitée par la connaissance de leurs indices de rétention, en particulier ceux définies par Kovats. C'est une méthode analytique basée sur les temps de rétention relatifs des composés présents dans l'échantillon qui permet une bonne comparaison des données de rétention chromatographique, ainsi que l'établissement d'une série de corrélations entre les données de rétention et les propriétés physiques de la structure physique du composés séparés. Cependant, la précision de la détermination des indices de rétention est soumise à certaines limitations instrumentales ou sources d'erreur, comme le montrent les essais de corrélation menés dans différents laboratoires. Les sources d'erreur qui ont pu influencer la précision et l'exactitude sont : le débit et la température de la colonne, la pureté des phases mobile et stationnaire, l'activité du support, le temps de la colonne, l'extrapolation, etc... [68, 87,88].

### **II.6.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance**

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique de séparation, d'identification et de quantification des molécules à hautes poids moléculaires [48].

Une caractéristique notable de la HPLC est qu'elle convient souvent aux composés organiques trop instables ou insuffisamment volatils pour pouvoir être analysée par chromatographie en phase gazeuse sans dérivatisation préalable. Il convient à la séparation d'une large gamme de produits chimiques, notamment les produits pharmaceutiques, les aliments, les industries lourdes et les produits biochimiques [89].

L'HPLC utilise principalement une colonne contenant la phase stationnaire, une pompe qui déplace la ou les phases mobiles à travers la colonne, et un détecteur qui montre les temps de rétention des molécules. Le temps de rétention varie en fonction des interactions entre la phase stationnaire, les molécules étant analysé et le ou les solvants utilisés. L'échantillon à analyser est introduit en petit volume dans le flux de la phase mobile et il est retardé par des interactions chimiques ou physiques spécifiques avec la phase stationnaire. La quantité de retard dépend de la nature de l'analyte et de la composition de la phase stationnaire et mobile. Le moment auquel un analyte spécifique élu (sort de la fin de la colonne) est appelé le temps de rétention [48].

L'identification des composés analysés par l'HPLC est confirmée par leurs temps de rétention tirés de la littérature [48].

*Chapitre III :*

*Travaux antérieurs et principaux métabolites  
secondaires isolés*

### III.1. Matériel végétal

Le présent chapitre résume les études phytochimiques, pharmacologiques et les utilisations médicinales d'une plante médicinale spontanée très utilisée pour ses vertus thérapeutiques : *Marrubium vulgare* L. ou marrube blanc de différentes régions d'Algérie et de la Tunisie.

Celle-ci est récoltée au moment de la floraison (mai, juin et août) [39, 91-95], et au moment de la végétation (janvier et février) [90, 95,96].

Afin que l'information soit plus utile au lecteur, en particulier pour les étudiants en master, nous avons préféré de présenter dans ce chapitre en plus des résultats obtenus, les expériences et les modes opératoires suivies pour cela à partir de la littérature.

### III.2. Identification séchage et conservation

Afin de garantir les bienfaits des plantes pour la santé et d'éviter des risques potentiels, il est nécessaire de les identifier. *Marrubium vulgare* L., peut être confondu avec *Ballota nigra* L., *Nepeta cataria* L., *Stachy germanicus* L., *Marrubium incantum* DESR, ou *Marrubium remotum* KIT [97]. C'est pourquoi l'identification est de la plus haute importance pour tous les tests ultérieurs.

Le séchage est utilisé pour déshydrater les plantes en réduisant le taux d'humidité qui favorise la détérioration biochimique, ainsi que la croissance des microorganismes au cours du stockage. La température de l'air de séchage est un facteur déterminant de la cinétique de séchage. Le taux de séchage diminue lorsque la température de séchage est basse. Toute augmentation de la température de l'air de séchage (50, 60, 70 et 80°C) augmente l'efficacité énergétique, tandis que toute augmentation du débit d'air (150 et 300 m<sup>3</sup>/h) a un effet inverse. Les feuilles de *M. vulgare* séchées à 80°C et 300 m<sup>3</sup>/h contiennent des quantités relativement élevées de phénols totaux par rapport à d'autres températures de séchage [98].

Une fois séchées, ils sont soumis à un broyage manuel afin d'obtenir une poudre prête à l'emploi. La poudre obtenue est conservée dans des flacons en verre ambré en vue des expérimentations.

### III.3. Composition phytochimique

#### Les huiles essentielles

L'huile essentielle de *Marrubium vulgare* est obtenue par hydrodistillation dont l'appareil le plus utilisée est de type Clevenger. L'opération se déroule jusqu'à extraction totale de l'HE (3 heures en moyenne) [90-95].

Afin de déterminer le rendement en HE, la formule suivante est utilisée [97] :

$$R\% = \frac{P_0 - P_1}{P_0} \times 100$$

**R%** : Rendement en huile essentielle.

**P<sub>0</sub>** : Poids initial.

**P<sub>1</sub>** : poids après séchage et extraction.

#### Identification de l'huile essentielle par GC/SM

La composition chimique de l'HE a été déterminée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC/SM).

Selon [90] le chromatographe en phase gazeuse est de la marque : Agilent Technologies ; modèle : 7890A avec colonne HP-5ms, 30 m de long x 0,32 mm ID x 0,25 µm d'épaisseur de film thicknesses. Le CG est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). L'azote est utilisé comme gaz vecteur. L'analyse des données est effectuée à l'aide du logiciel GC / MSD CHEMSTATION. Avant de charger l'huile, l'échantillon est purifié par filtration à l'aide d'un micro filtre de seringue en polytétrafluoroéthylène de 0,2 µm. 1µL de l'échantillon a ensuite été injecté manuellement dans le GC / MS à l'aide d'une micro seringue de 5µL (SGE, Australie). L'appareil est relié à un micro ordinateur gérant une bibliothèque de spectre de masse, qui permet l'identification des composés basés sur la comparaison de leurs indices de rétention [14].

Les conditions de l'analyse CG/SM sont données dans le tableau (III.1).

Tableau (III.1) : Conditions opératoires de CG/SM [90].

| CG/SM                      |                |
|----------------------------|----------------|
| Gaz porteur                | Azote          |
| Débit                      | 1,2 ml/min     |
| Température de l'injecteur | 250° C         |
| Température du détecteur   | 280° C         |
| Volume d'injection         | 1µl            |
| Ratio de partage           | 1 :70          |
| Temps d'exécution          | 20 min         |
| mode de fonctionnement     | Débit constant |

**Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare***

- **Odeur** : forte et désagréable [94,99].
- **Couleur** : jaune claire [94].

**Rendement en huile essentielle de *Marrubium vulgare*****Tableau (III.2) :** Rendement en huile essentielle de *Marrubium vulgare* récolté de différentes régions.

| N°              | Site de collection     | Période      | Organe             | Type d'extraction    | R%    | Réf  |
|-----------------|------------------------|--------------|--------------------|----------------------|-------|------|
| S <sub>1</sub>  | Zeddine/Ain defla      | Jan 2016     | Partie<br>aérienne | Hydrodistillation 3h | 0,3   | [90] |
| S <sub>2</sub>  | Rouina/Ain defla       | Jan 2016     | Partie<br>aérienne | Hydrodistillation 3h | 0,35  | [90] |
| S <sub>3</sub>  | Nigrine/Tbessa         | Mai 2009     | Partie<br>aérienne | Hydrodistillation 4h | 0,05  | [91] |
| S <sub>4</sub>  | Rezarza/Médéa          | Mai 2013     | Feuilles           | Hydrodistillation 3h | 0,048 | [92] |
| S <sub>5</sub>  | Sétif                  | Juin 2003    | Partie<br>aérienne | Hydrodistillation 3h | 0,05  | [93] |
| S <sub>6</sub>  | Beni-<br>Snous/Tlemcen | Fév 2014     | Partie<br>aérienne | Hydrodistillation 5h | 0,3   | [95] |
| S <sub>7</sub>  | Ain témouchent         | Jan 2016     | Partie<br>aérienne | Hydrodistillation 3h | 0,36  | [90] |
| S <sub>8</sub>  | Alger                  | Jan 2016     | Partie<br>aérienne | Hydrodistillation 3h | 0,2   | [90] |
| S <sub>9</sub>  | Batna                  | Jan 2016     | Partie<br>aérienne | Hydrodistillation 3h | 0,15  | [90] |
| S <sub>10</sub> | Tunisie                | Aout<br>2005 | Partie<br>aérienne | Hydrodistillation 2h | 0,02  | [94] |

L'huile essentielle isolée de *Marrubium vulgare* a donné différents rendements selon la durée d'extraction utilisée (0,02% à 0,36% pendant une durée de 2 heures à 5heures).

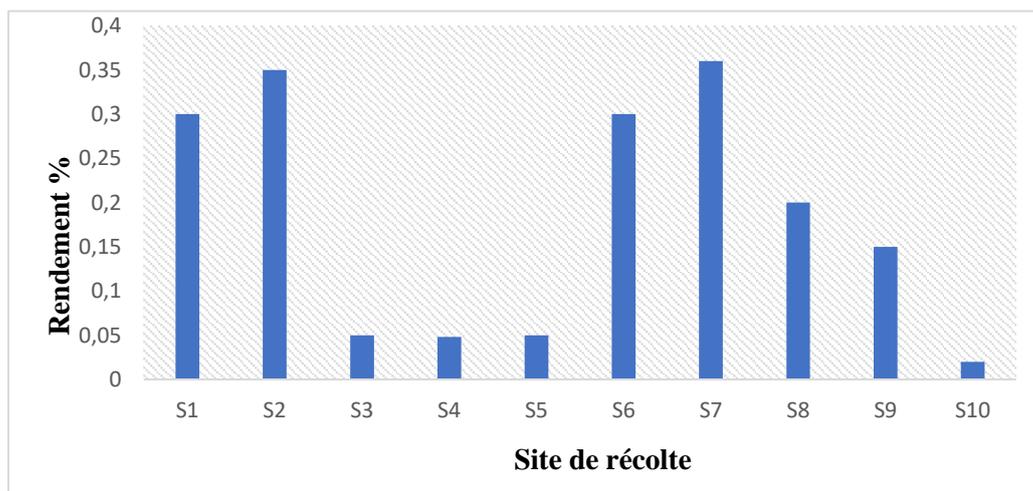
Le rendement le plus élevé (0,36%) a été obtenu à partir de la plante d'Ain Témouchent [90] et le plus faible (0,048%) c'est celle de Médéa [93] qui était environ 7 fois inférieur.

Les parties aériennes de *Marrubium vulgare* récoltés durant la période de floraison (mai-juin-août) atteinte le plus faible rendement en huile essentielle varié entre 0,048% et 0,2%.

Celles récoltés durant la période de végétation (janvier – février) atteinte le rendement le plus élevé varié entre 0,3% et 0,36%.

On peut déduire donc que, les rendements en huiles essentielles des parties aériennes de *Marrubium vulgare* varient en fonction de nombreux facteurs tels que : les conditions climatiques, géographiques, la saison de récolte et la durée d'extraction de l'huile essentielle.

La figure (III.1) représente la variation de rendement suivant les différentes régions.



**Figure III.1 :** Variation du rendement de l'HE de *Marrubium vulgare* dans différentes régions.

Composition chimique de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*Tableau (III.3) : Les principaux constituants de l'huile essentielle de *M. vulgare* [90-95].

|                                  | S1   | S2   | S3   | S4    | S5   | S6  | S7   | S8   | S9   | S10  |
|----------------------------------|------|------|------|-------|------|-----|------|------|------|------|
| <b>Principaux constituants %</b> |      |      |      |       |      |     |      |      |      |      |
| <i>Tricyclene</i>                | 3,4  | 3,7  | -    | -     | -    | -   | Nd   | 0,6  | Tr   | 0,8  |
| <i>α-Pinene</i>                  | 0,5  | 0,6  | 9,37 | 1,56  | 1,8  | -   | 3,4  | 0,3  | 0,1  | 0,4  |
| <i>β-Pinene</i>                  | 3,8  | 2,5  | -    | -     | -    | -   | 4,1  | -    | -    | -    |
| <i>δ-Elemene</i>                 | 1,7  | -    | -    | -     | -    | -   | 0,7  | 0,4  | 0,4  | -    |
| <i>α-Copaene</i>                 | 3,9  | 3,1  | -    | 1,12  | 0,2  | 0,2 | 3,2  | -    | 1,1  | -    |
| <i>α-Cedrene</i>                 | 1,9  | 1,7  | -    | -     | -    | -   | 0,2  | 1,4  | 1,4  | -    |
| <i>β-Caryophyllene</i>           | 10,8 | 10,5 | -    | 11,15 | 3,9  | -   | -    | 10,9 | 3,4  | -    |
| <i>α-Humulene</i>                | 2,1  | 4,3  | 0,12 | 1,3   | 0,4  | Tr  | -    | 0,5  | 1,1  | 0,6  |
| <i>E-β-Farnésene</i>             | 1,8  | 1,4  | -    | -     | -    | 3,4 | -    | 34,8 | 1,4  | 7,4  |
| <i>Germacrène-D</i>              | 37,9 | 37,7 | 9,61 | 6,7   | 0,3  | 1,1 | 2,4  | 2,1  | 2,6  | 2,4  |
| <i>β-Bisabolène</i>              | 4,6  | 5,9  | -    | 10,3  | 10,9 | 2,5 | 10,9 | 10,9 | 43,4 | 28,3 |
| <i>γ-Cadinène</i>                | 2,9  | 2,8  | 0,44 | 0,45  | -    | -   | -    | 2,7  | 2,4  | -    |
| <i>E-Nerolidol</i>               | 2,3  | 2,6  | -    | -     | -    | -   | 2,4  | 2,8  | 3,3  | -    |
| <i>Farnesol</i>                  | 3,9  | 3,4  | -    | -     | -    | -   | -    | 0,4  | -    | -    |
| <i>acide<br/>hexadecanoïque</i>  | 3,5  | 3,4  | -    | -     | -    | -   | 0,3  | Tr   | -    | -    |
| <i>β-Elemene</i>                 | 1,4  | 1,6  | -    | 0,15  | 0,2  | 0,3 | -    | 1,7  | 0,1  | -    |
| <i>δ-Cadinene</i>                | 1,4  | 2,9  | 0,44 | 9,7   | 0,3  | 1,2 | 32,1 | 0,2  | 10,2 | 0,1  |
| <i>1,8-Cineole</i>               | -    | -    | 0,1  | 3,25  | -    | -   | 5,3  | 5,2  | -    | 4,8  |
| <i>Isobornyl acétate</i>         | -    | -    | -    | -     | -    | -   | 4,9  | -    | -    | -    |
| <i>Isocaryophyllene</i>          | -    | -    | -    | -     | -    | -   | 7,7  | -    | 5,1  | -    |
| <i>E-β-Lonone</i>                | -    | -    | -    | -     | -    | 4,5 | 4,1  | -    | 1,6  | -    |
| <i>Bicyclogermacrene</i>         | -    | -    | -    | -     | -    | 0,3 | 4,1  | -    | Tr   | -    |
| <i>Tétradecane</i>               | -    | -    | -    | -     | -    | -   | -    | -    | -    | -    |
| <i>E-β-Caryophyllene</i>         | -    | -    | -    | -     | -    | 5,3 | -    | -    | -    | -    |

Tableau (III.3) (suite) : Les principaux constituants de l'huile essentielle de *M. vulgare*.

|   | S1   | S2   | S3    | S4    | S5   | S6   | S7   | S8   | S9   | S10  |
|---|------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|
| <b>Principaux constituants %</b>                |      |      |       |       |      |      |      |      |      |      |
| <i>Caryophyllene</i>                            | -    | -    | -     | -     | -    | 7,2  | -    | -    | 3,4  | -    |
| <i>(E)-Phytol</i>                               | -    | -    | -     | -     | -    | 11,4 | -    | -    | -    | -    |
| <i>Benzaldehyde</i>                             | -    | -    | 2,31  | -     | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>1-Octen-3-ol</i>                             | -    | -    | 2,35  | 2,3   | 1,7  | 3,5  | -    | -    | -    | -    |
| <i>4,8,12,16-Tétraméthyl heptadecane-4-olid</i> | -    | -    | 16,97 | -     | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Myrcene</i>                                  | 0,6  | 0,5  | 0,47  | 2,1   | 2,0  | -    | 0,2  | 0,6  | 0,2  | -    |
| <i>P-Cymene</i>                                 | -    | -    | 0,63  | 2,74  | 2,5  | -    | -    | 0,7  | -    | 0,5  |
| <i>Linalool</i>                                 | 0,5  | 0,4  | -     | 2,1   | 1,7  | 1,1  | 0,5  | 3,6  | 2,9  | 0,3  |
| <i>α-Thujone</i>                                | -    | -    | -     | 2,39  | -    | 0,6  | -    | -    | -    | 1,1  |
| <i>β-Citronellol</i>                            | -    | -    | -     | 9,13  | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Carcavrol</i>                                | -    | -    | -     | 1,8   | 0,7  | -    | Tr   | 0,5  | 3,5  | -    |
| <i>Eugenol</i>                                  | 1,2  | 1,5  | -     | 21,5  | 50,1 | -    | -    | 4,1  | 0,5  | 3,3  |
| <i>Geranyl linalool</i>                         | -    | -    | -     | -     | -    | 1,6  | -    | -    | -    | 3,5  |
| <i>Tricosane</i>                                | -    | -    | 0,96  | -     | -    | 23,1 | -    | -    | -    | -    |
| <b>Constituants regroupés %</b>                 |      |      |       |       |      |      |      |      |      |      |
| <b>Hydrocarbures monoterpènes</b>               | 9,6  | 8,6  | 12,61 | 7,19  | 8,3  | 0,5  | 1,8  | 4,3  | 9,5  | 2,9  |
| <b>Monoterpènes contenant de l'oxygène</b>      | 0,5  | 0,4  | 9,64  | 19,65 | 2,4  | 1,7  | 6,4  | 13,1 | 10,7 | 11,3 |
| <b>Hydrocarbures sesquiterpènes</b>             | 73,4 | 75   | 5,58  | 43,28 | 16,8 | 22,1 | 75,9 | 68,1 | 68,4 | 50,5 |
| <b>Sesquiterpènes contenant de l'oxygène</b>    | 6,8  | 6,6  | 13,17 | 0,78  | 0,8  | 20,1 | 4,7  | 6,1  | 4,2  | 1,4  |
| <b>Autre</b>                                    | 5,5  | 5,6  | 41,64 | 26,82 | 61,6 | 47,5 | 8,1  | 5,5  | 4,8  | 8,5  |
| <b>Taux d'identification</b>                    | 95,8 | 96,2 | 82,46 | 97,72 | 90   | 91,9 | 97,2 | 97,1 | 97,6 | 74,6 |

La composition chimique de l'huile essentielle de *M. vulgare* collectées de différentes régions est résumée dans le tableau (III.3). Les composés identifiés représentent 74,6% à 97,72% du total des huiles essentielles étudiées.

Des différences majeures ont été trouvées dans la composition de l'huile essentielle de *M. vulgare*. En général, il est caractérisé par la haute proportion de  $\beta$ -Bisabolène (2,5% - 43,4%), *Germacrène-D* (0,3% - 37,9%), *E*- $\beta$ -Caryophyllène (5,3%), *E*- $\beta$ -Farnésène (1,4% - 34,8%),  $\alpha$ -Humulène (0,12% - 4,3%),  $\delta$ -Cadinène (0,1% - 32,1%), (*E*)-Phytol (11,4%), *Eugénol* (0,5 - 21,5%), *Géranyllinalol* (1,6% - 3,5%), *Isocaryophyllène* (5,1% - 7,7%),  $\beta$ -Caryophyllène (3,4% - 11,15%), 4,8,12,16-tetraméthylheptadecan-4-olide (16,97%) et *Tricosane* (0,96% - 23,1%).

Les hydrocarbures sesquiterpènes présentent la major fraction de la composition de l'huile essentielle de *M. vulgare* (5,58% à 75,9%), tandis que le  $\beta$ -Bisabolène, *Germacrène-D* et *Eugénol* représentent les majors composants dans tous les échantillons.

Le taux des hydrocarbures monoterpènes, les monoterpènes et les sesquiterpènes contenant de l'oxygène est le plus élevé dans les huiles essentielles isolées des parties aériennes collectées durant la phase végétative (S1, S2, S6, S7, S8, S9) que dans la phase de floraison (S3, S4, S5, S10).

On peut conclure que, la différence de la composition chimique de l'huile essentielle est due principalement à la variation de régions et de la saison de collecte.

La figure (III.2) présente la structure chimique des composés prédominant dans l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*.

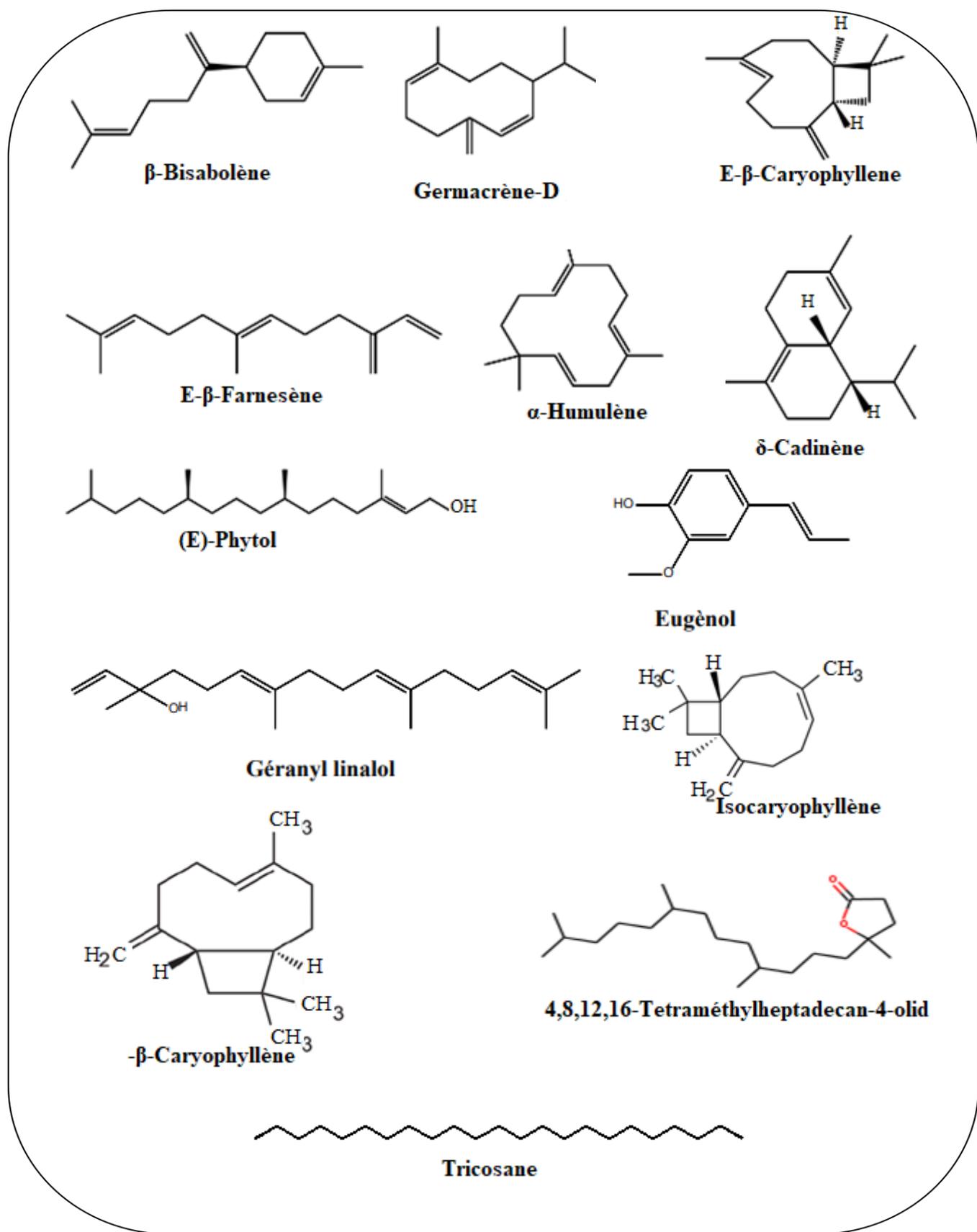


Figure III.2 : Composés majoritaires identifiés dans l'HE de *Marrubium vulgare* [88].

## **Screening phytochimique**

### **Extraction des composés phénolique**

L'extraction des composés phénoliques se fait généralement par l'extracteur Soxhlet [21] ou par macération [39,42,96,99,100]. Ces deux méthodes sont les plus utilisées pour l'extraction des métabolites secondaires.

### **Les tanins**

2 à 3 gouttes de la solution de  $\text{FeCl}_3$  à 1% sont ajoutées à 2 ml de la solution à tester. L'apparition d'une couleur bleu-noir et un précipité après quelques minutes indique la présence des tanins [96].

### **Les alcaloïdes**

2 ml d'HCl dilué sont ajoutés à l'extrait éthanolique, ensuite on ajoute 2 gouttes de réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité orange indique la présence d'alcaloïdes [96].

### **Les saponosides**

10 ml de l'extrait aqueux ont été versé dans un tube à essai. Le tube a été soumis à une agitation pendant 15 s puis laissé au repos durant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indiquait la présence de saponosides [97].

### **Les flavonoïdes**

5ml d'extrait à tester ont été versé dans un tube à essai ensuite, quelques gouttes d'HCl et quelques copeaux de magnésium sont ajoutés. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des flavonoïdes [96].

**Dosage des polyphénols totaux :**

La quantification des polyphénols totaux est estimée selon la méthode colorimétrique en suivant le protocole décrit par [14]. 250 µl de réactif de Folin-Ciocalteu sont ajoutés à 50 µl d'extrait hydroalcoolique dilués dans 2,5 ml d'eau distillée. Le mélange est agité à l'aide d'un agitateur vortex pendant 10 secondes. Puis, 500 µl de carbonate de sodium 20% ont été ajoutés. Le mélange est agité pour la 2<sup>ème</sup> fois pendant 10 secondes. Les tubes sont incubés pendant 30 min à 40°C.

Le mélange a été maintenu à la température ambiante et à l'obscurité pendant 60 min, avant lecture de l'absorbance à 765 nm.

Les concentrations des polyphénols totaux sont calculées à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0, 100, 200, 300, 400 et 500 mg/l) et exprimé en gramme équivalent de matière sèche (g EAG/g).

**Dosage des flavonoïdes totaux**

La quantification des flavonoïdes de la partie aérienne de la plante a été réalisée selon le protocole décrit par [14] en utilisant la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>).

1500 µl d'eau distillée et 150 µl de nitrate de sodium à 5% sont mélangés avec 500 µl d'extrait hydroalcoolique. Le mélange a été laissé reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 5 min. ensuite, 150 µl de trichlorure d'aluminium à 10% ont été additionnée au mélange et laissé reposer pendant 11 min à l'obscurité. Après le repos, 500 µl de soude 1M ont été ajoutés. Le mélange a été soumis à une agitation au vortex et son absorbance a été lue au spectrophotomètre UV-Visible à 510 nm.

La concentration des flavonoïdes a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage  $y = ax + b$  établie avec la catéchine à différentes concentrations (0, 10, 20, 30, 40 et 50 mg/l). Les résultats ont été exprimées en gramme d'équivalent de (+/-) catéchine par gramme de matière sèche (g EC/g).

Les résultats du screening phytochimique sont résumés dans le tableau (III.4) :

**Tableau (III.4) :** Métabolites secondaires mis en évidence dans *Marrubium vulgare*.

| M.S \ Réf                  | [42] | [101] | [99] | [102] | [103] | [100] |
|----------------------------|------|-------|------|-------|-------|-------|
| <b>Saponines</b>           | +    | /     | +    | +     | +     | +     |
| <b>Tanins</b>              | +    | +     | +    | +     | +     | +     |
| <b>Flavonoïdes</b>         | +    | +     | +    | +     | +     | +     |
| <b>Alcaloïdes</b>          | -    | /     | /    | +     | /     | -     |
| <b>Terpènes et stérols</b> | +    | /     | /    | +     | -     | +     |

+ : présence      - : absence

Par comparaison des résultats de screening phytochimique montrés dans le tableau (III.4), *M. vulgare* est constitué principalement de saponines, de tanins et de flavonoïdes.

En revanche, certaines études ont marqué la présence des alcaloïdes et des terpènes [42, 100,102] et leurs absences dans certains d'autres [42,100,103].

**Tableau (III.5) :** Teneur en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux de différentes parties de *M. vulgare*.

| Organes                                    | Extraits         | Flavonoïdes totaux <sup>a</sup> | Polyphénols totaux <sup>b</sup> | Réf          |
|--|------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------|
| <b>Feuilles</b>                            | E <sub>MET</sub> | 10,09±0,43                      | 64,87±1,03                      | <b>[104]</b> |
|  | E <sub>Ch</sub>  | 9,73±1,54                       | 52,33±1,46                      |              |
|  | E <sub>AE</sub>  | 25,78±1,46                      | 254,68±1,06                     |              |
|  | E <sub>aq</sub>  | 4,01±0,91                       | 48,62±1,73                      |              |
| <b>Fleurs</b>                              | E <sub>MET</sub> | 16,34±1,29                      | 60,02±0,59                      |              |
|  | E <sub>Ch</sub>  | 11,46±1,45                      | 54,25±1,01                      |              |
|  | E <sub>AE</sub>  | 22,62±1,23                      | 157,31±1,82                     |              |
|  | E <sub>aq</sub>  | 3,69±0,47                       | 45,15±1,52                      |              |
| <b>Tiges</b>                               | E <sub>MET</sub> | 5,21±0,23                       | 49,34±1,12                      |              |
|  | E <sub>Ch</sub>  | 6,82±0,62                       | 75,00±0,92                      |              |
|  | E <sub>AE</sub>  | 16,74±0,88                      | 328,16±1,89                     |              |
|  | E <sub>aq</sub>  | 3,07±0,94                       | 44,32±1,48                      |              |
| <b>Racines</b>                             | E <sub>MET</sub> | 1,92±0,76                       | 26,20±1,63                      |              |
|  | E <sub>Ch</sub>  | 3,38±0,85                       | 47,93±0,69                      |              |
|  | E <sub>AE</sub>  | 6,34±0,89                       | 88,65±1,90                      |              |
|  | E <sub>aq</sub>  | 2,05±0,77                       | 10,39±0,64                      |              |
| <b>Fleurs et<br/>sommités<br/>fleuries</b> | E <sub>EP</sub>  | 0,70±0,05                       | 1,2±0,52                        | <b>[105]</b> |
|  | E <sub>déc</sub> | 0,94±0,14                       | 1,27±0,94                       |              |
|  | E <sub>MET</sub> | 18,0±0,75                       | 3,42±0,85                       |              |
|  | E <sub>aq</sub>  | 4,34±0,078                      | 3,07±0,76                       |              |
| <b>Feuilles</b>                            | E <sub>MET</sub> | /                               | 17,08±0,52                      | <b>[42]</b>  |
| <b>Feuilles</b>                            | E <sub>MET</sub> | 10,49±0,08                      | /                               | <b>[101]</b> |
| <b>Partie aérienne</b>                     | E <sub>MET</sub> | /                               | 18,21±0,20                      | <b>[21]</b>  |
| <b>Feuilles</b>                            | E <sub>MET</sub> | /                               | 2,68                            | <b>[106]</b> |
| <b>Feuilles</b>                            | E <sub>MET</sub> | 0,1                             | 0,17                            | <b>[107]</b> |
|  | E <sub>EP</sub>  | 0,006                           | /                               |              |
|  | E <sub>AE</sub>  | 0,14                            | /                               |              |
|  | E <sub>But</sub> | 0,0022                          | /                               |              |

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

**a** : mg EQ/ml d'extrait

**b** : mg EAG/ml d'extrait

Les résultats présentés dans le tableau (III.5) révèlent que l'extrait d'acétate d'éthyle des tiges est le plus riche en polyphénols totaux ( $325,16 \pm 1,89$  mg EAG/ml d'extrait) suivi par l'E<sub>AE</sub> de feuilles ( $254,68 \pm 1,06$  mg EAG/ml d'extrait), de fleurs ( $157,31 \pm 1,81$  mg EAG/ml d'extrait) et de racines ( $88,65 \pm 1,90$  mg EAG/ml d'extrait). Alors que, l'E<sub>AE</sub> des feuilles ( $25,78 \pm 1,46$  mg EQ/ml d'extrait) est le plus riche en flavonoïdes totaux suivi par l'E<sub>AE</sub> des fleurs ( $22,62 \pm 1,23$  mg EQ/ml d'extrait), l'E<sub>AE</sub> des tiges ( $16,74 \pm 0,88$  mg EQ/ml d'extrait) et l'E<sub>AE</sub> des racines ( $6,34 \pm 0,89$  mg EQ/ml d'extrait) respectivement.

L'extrait chloroformique E<sub>ch</sub> contient une quantité importante en polyphénols totaux ( $47,93 \pm 93$  à  $75,00 \pm 0,92$  mg EAG/ml d'extrait) suivie par l'extrait méthanolique brut ( $0,17$  à  $64,87 \pm 1,03$  mg EAG/ml d'extrait) et l'extrait aqueux ( $3,07 \pm 0,76$  à  $48,62 \pm 1,73$  mg EAG/ml d'extrait) respectivement.

L'extrait de dichlorométhane E<sub>déc</sub>, l'extrait d'éther de pétrole E<sub>EP</sub> et l'extrait butanolique E<sub>but</sub> sont faiblement constitués (à l'état de trace) en polyphénols et en flavonoïdes totaux ( $1,27 \pm 0,94$  mg EAG/ml d'extrait et  $0,94 \pm 0,14$  mg EQ/ml d'extrait), ( $0,006$  mg EQ/ml d'extrait) et ( $0,0022$  mg EQ/ml d'extrait) respectivement.

Par conclusion, *Marrubium vulgare* est riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux qui se concentre principalement dans ces parties aériennes.

#### III.4. Application en médecine et en tant que pesticides

##### Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation.

##### Test de DPPH

La capacité antioxydante de l'huile essentielle et des extraits organique de *Marrubium vulgare* a été déterminé par l'activité de piégeage des radicaux DPPH. Cette méthode a été choisie en raison du fait que la DPPH a l'avantage de ne pas être affectée par certaines réactions secondaires, telles que la chélation des ions métalliques et l'inhibition enzymatique [67]. Pour cela la méthode décrite par « Sanchez-Moreno » [107] est utilisée avec quelques modifications.



Avec :

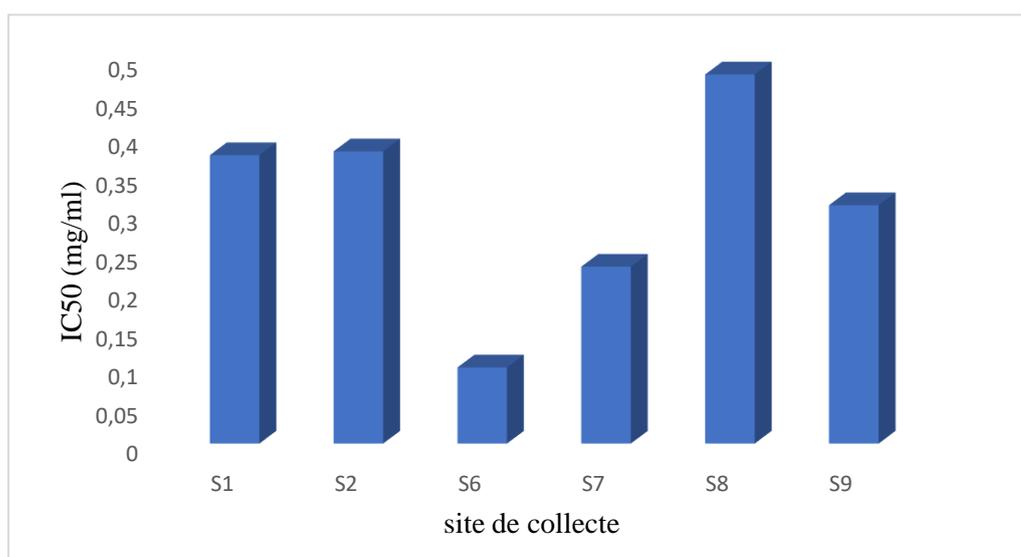
**A<sub>c</sub>** : Absorbance du contrôle.

**A<sub>E</sub>** : Absorbance de l'échantillon (Absorbance du test « échantillon + DPPH » - Absorbance du blanc du test « échantillon + méthanol »).

La valeur d'IC<sub>50</sub>, la concentration de l'extrait nécessaire pour piéger 50 % de radicaux libres, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'échantillons préparés.

**Tableau (III.6) :** IC<sub>50</sub> de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* de différentes régions en µg/ml.

| N°         | IC 50% (µg/ml) | Réf  |
|------------|----------------|------|
| <b>S1</b>  | 375            | [89] |
| <b>S2</b>  | 380            | [90] |
| <b>S6</b>  | 99             | [95] |
| <b>S7</b>  | 230            | [96] |
| <b>S8</b>  | 480            | [90] |
| <b>S9</b>  | 310            | [90] |
| <b>BHT</b> | 33             | [90] |



**Figure III.4 :** IC<sub>50</sub> de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* obtenu par différentes régions.

Les résultats du tableau (III.6) et de l'histogramme illustré dans la figure (III.4) indiquent que l'huile essentielle de *M. vulgare* présente une valeur d'IC<sub>50</sub> variée de 99 µg/ml à 480 µg/ml, soit environ 3 fois plus que l'antioxydant synthétique (BHT).

L'IC<sub>50</sub> est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée [42]. Dans ce cas, on peut dire que l'ordre de l'efficacité est le suivant : BHT > S6 > S7 > S9 > S1 > S2 > S6.

Donc, l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *M. vulgare* est donc relativement dépendante de la phase de récolte et de la composition chimique, dont l'HE extrait au moment de floraison possède une forte activité antioxydante par rapport au ceux extrait durant la phase de végétation, ce qu'il permet de l'utiliser comme une source efficace d'antioxydants d'origine naturel.

**Tableau (III.7) :** IC<sub>50</sub> des extraits de *Marrubium vulgare* en µg/ml.

| Extrait<br>Parties<br>utilisées | IC <sub>50</sub> (µg/ml) |      |                  |                 |                 |                 |                 |                 |                   | Réf          |
|---------------------------------|--------------------------|------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|--------------|
|                                 | FLV                      | TAN  | E <sub>Met</sub> | E <sub>Ch</sub> | E <sub>AC</sub> | E <sub>Cr</sub> | E <sub>Hx</sub> | E <sub>aq</sub> | E <sub>ETOH</sub> |              |
| <b>Feuilles</b>                 | 620                      | 1390 | 450              | -               | -               | -               | -               | -               | -                 | [42]         |
|                                 | -                        | -    | 83               | -               | -               | -               | -               | -               | -                 | [101]        |
|                                 | -                        | -    | -                | -               | -               | -               | -               | -               | 20                | [96]         |
|                                 | -                        | -    | 490              | -               | -               | -               | -               | -               | -                 | [21]         |
|                                 | -                        | -    | 103              | 135             | 42              | -               | -               | 235             | -                 | [104]        |
| <b>Feuilles (T)</b>             | -                        | -    | -                | 33              | 100             | 33              | 330             | 360             | -                 | <b>[111]</b> |
| <b>Feuilles (M)</b>             | -                        | -    | -                | 41              | 58              | 50              | 330             | 350             | -                 |              |
| <b>Feuilles (S)</b>             | -                        | -    | -                | 40              | 50              | 110             | 730             | 360             | -                 |              |
| <b>Fleurs</b>                   | -                        | -    | 107              | 128             | 64              | -               | -               | 250             | -                 | <b>[104]</b> |
| <b>Tiges</b>                    | -                        | -    | 110              | 928             | 21              | -               | -               | 267             | -                 |              |
| <b>Racines</b>                  | -                        | -    | 271              | 178             | 89              | -               | -               | 285             | -                 |              |

T = mont de Tessala, M = forêt de M'sila, S = Ain Skhouana

Les résultats montrés dans le tableau (III.7) révèlent que les valeurs des IC<sub>50</sub> comprises entre  $20 \pm 0,002 \mu\text{g/ml}$  (E<sub>ETOH</sub>) et  $1390 \mu\text{g/ml}$  (tanins).

Des valeurs élevées d'IC<sub>50</sub> ont été marqués par les tanins ( $1390 \mu\text{g/ml}$ ) [42], l'E<sub>ch</sub> de tiges ( $928 \mu\text{g/ml}$ ) [104], le SE<sub>HX</sub> de feuilles ( $730 \mu\text{g/ml}$ ) [110] et des flavonoïdes ( $620 \mu\text{g/ml}$ ) [42] respectivement, ce qui manifeste par un faible pouvoir antiradicalaire.

Des valeurs faibles de IC<sub>50</sub> ont été marquées par l'extrait éthanolique E<sub>ETOH</sub> de ... ( $20 \pm 0,002 \mu\text{g/ml}$ ) [96], l'E<sub>AC</sub> de tiges ( $33 \mu\text{g/ml}$ ) [104], le TE<sub>cr</sub> de feuilles ( $33 \mu\text{g/ml}$ ) [110], le SE<sub>AC</sub> ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) [110] et le ME<sub>cr</sub> de feuilles ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) [110] respectivement, ce qui manifeste par un fort pouvoir antiradicalaire.

Par comparaison des résultats, l'extrait méthanolique brut E<sub>Met</sub> a montré une forte activité antiradicalaire vis-à-vis à l'extrait aqueux E<sub>aq</sub>.

Alors, la méthode d'extraction, le solvant choisi, la durée et la région de récolte influent principalement sur le pouvoir antioxydant du *Marrubium vulgare*.

### Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle et des extraits organiques et aqueux de *Marrubium vulgare* L a été réalisée par la méthode d'aromatogramme. C'est une méthode de diffusion sur milieu gélosé qui permet de déterminer l'activité inhibitrice des extraits par mesure du diamètre d'inhibition, autour d'un disque imprégné de celle-ci, ou d'un produit à base des extraits de la plantes [111].

### Préparation des dilutions des extraits de *Marrubium vulgare*

Les solutions des extraits sont préparées dans le Diméthyle sulfoxyde (DMSO) dont les dilutions sont préparées de façon à obtenir des concentrations au :

- ✓  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ , (mg/ml) pour les flavonoïdes et les tanins.
- ✓ 20, 40, 60, 80 et 100 (mg/ml) pour les extraits organiques et aqueux, à partir de la solution mère.

### Méthode de diffusion sur milieu gélosé

Des plaques de gélose nutritive stérile de Muller-Hinton ont été préparées et incubées à 37°C pendant 24 h pour vérifier toute contamination. L'inoculum est préparé afin d'obtenir une densité bactérienne finale d'environ 10<sup>6</sup> CFU/ml. Les souches bactériennes sont activées à 37°C par repiquage sur milieu gélosé Muller-Hinton (MH).

Des disques de papier filtre stérile (Whatman n°1) de 6 mm de diamètre ont été trempés par les diverses solutions pour l'HE, les extraits organiques et aqueux et placés en position appropriée sur la surface de la plaque avec des quadrants marqués à l'arrière des boîtes de pétri. Des disques témoins imprégnés d'antibiotique sont inclus dans les essais.

### Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI et de la concentration minimale bactéricide CMB

La CMI est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible à l'œil nu d'une souche bactérienne après 24 heures d'incubation à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique [112].

La CMB correspond à la concentration la plus faible de l'échantillon à laquelle 99,99% des bactéries sont tuées après 24 h d'incubation à 37°C [112].

### Lecture de l'antibiogramme

La lecture a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque, en millimètre (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle ou de l'extrait organique [113].

**Tableau (III.8) :** Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition [113].

| Sensibilité                    | Zone d'inhibition                 |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| Non sensible ou résistante (-) | Diamètre < 8mm                    |
| Sensible (+)                   | Diamètre compris entre 9 à 14 mm  |
| Très sensible (++)             | Diamètre compris entre 15 à 19 mm |
| Extrêmement sensible (+++)     | Diamètre > 20 mm                  |

### L'activité antifongique

Les mêmes étapes précédentes sont effectuées avec les souches fongiques, sauf que le milieu de culture utilisé dans ce cas est la gélose de Sabouraud favorable à la croissance des espèces fongiques. Ces dernières sont activées par repiquage sur la gélose de Sabouraud pendant 24 heures à l'obscurité à 37°C.

La lecture de l'antibiogramme a été faite après incubation des plaques à 28°C pendant 7 jours.

**Tableau (III.9) :** Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* [90].

| Souches bactériennes    | Diamètres des zones d'inhibition (mm) |            |            |            |            | Amoxicilline (30 µg/disque) |
|-------------------------|---------------------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------------------------|
|                         | S1                                    | S2         | S7         | S8         | S9         |                             |
| <i>L. monocytogenes</i> | 20,29±0,33                            | 20,50±0,33 | 24,33±0,50 | 27,17±0,29 | 23,50±0,90 | 30,33±1,04                  |
| <i>S. aureus</i>        | 20,16±0,50                            | 20,67±0,29 | 25,50±0,33 | 26,33±0,50 | 23,67±0,50 | 17,83±0,76                  |
| <i>S. enterica</i>      | 13,67±0,29                            | 13,17±0,50 | 17,17±0,50 | 20,33±0,29 | 16,33±0,33 | 20,67±0,58                  |
| <i>E. coli</i>          | 14,50±0,16                            | 14,29±0,33 | 19,00±0,29 | 21,17±0,16 | 17,67±0,50 | 29,50±0,50                  |
| <i>K. pneumoniae</i>    | 13,67±0,50                            | 13,17±0,50 | 18,50±0,50 | 19,50±0,50 | 16,29±0,29 | 40,17±0,29                  |
| <i>P. aeruginosa</i>    | 11,67±0,50                            | 12,33±0,50 | 17,33±0,33 | 20,33±0,33 | 16,67±0,33 | 29,33±0,58                  |

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

L'huile essentielle de S8 a montré une forte activité antibactérienne ( $\geq 26$  mm) contre les souches bactériennes Gram positif (+) : *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* comparable à celle de l'antibiotique et une activité similaire à celle de l'amoxicilline contre la bactérie Gram négatif (-) : *Salmonella enterica*.

L'HE de (S1, S2, S7, S8, S9) possède une action inhibitrice modérée à élevée (zone d'inhibition  $\geq 11$ mm) vis-à-vis aux souches bactériennes Gram + et Gram -.

Tous les échantillons d'huiles essentielles étudiée (S1, S2, S7, S8, S9) montrés dans le tableau (III.9) ont marqué une activité antibactérienne plus élevée ( $\geq 20$  mm) que l'antibiotique contre *S. aureus*, cela explique la forte capacité inhibitrice de l'HE de *M. vulgare* contre les souches bactériennes.

**Tableau (III.10) :** Activité antifongique de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* [90].

| Souches fongiques   | Diamètres des zones d'inhibition (mm) |            |            |            |            | Amoxicilline (30µg/disque) |
|---------------------|---------------------------------------|------------|------------|------------|------------|----------------------------|
|                     | S1                                    | S2         | S7         | S8         | S9         |                            |
| <i>F. culmorum</i>  | 12,29±0,50                            | 13,50±0,29 | 16,00±0,33 | 17,50±0,16 | 15,29±0,16 | Non détecté                |
| <i>A. ochraceus</i> | 11,67±0,33                            | 11,50±0,50 | 16,67±0,16 | 16,67±0,33 | 14,33±0,50 | Non détecté                |
| <i>A. flavus</i>    | 11,50±0,67                            | 10,67±0,29 | 15,00±0,33 | 15,50±0,29 | 14,16±0,29 | Non détecté                |
| <i>C. albicans</i>  | 11,29±0,29                            | 12,50±0,50 | 15,00±0,33 | 17,00±0,29 | 15,50±0,29 | Non détecté                |

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

L'huile essentielle de S<sub>7</sub>, S<sub>8</sub> et S<sub>9</sub> montrent une forte activité antifongique (zone d'inhibition ≥ 14 mm) contre toutes les souches fongiques étudiées.

L'HE de S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> marquent une activité inhibitrice modérée (zone d'inhibition ≥ 10 mm) contre *aspergillus flavus* et *aspergillus ochraceus*, et modérée à élevée (zone d'inhibition ≥ 12 mm) contre *candida albicans* et *fusarium culmorum*.

Par conclusion, les résultats des tableaux (III.9) et (III.10) ont montré que l'efficacité antibactérienne et antifongiques de l'HE de *M. vulgare* varié en fonction de la variation géographique et de souches étudiées.

### Activité antimicrobienne des extraits organique et aqueux de *Marrubium vulgare*

L'activité antibactérienne et antifongique des différents extraits organiques et aqueux du *M. vulgare* sont résumés dans les tableaux (III.11) et (III.12) respectivement.

**Tableau (III.11) :** Activité antibactérienne des extraits organiques et aqueux de *Marrubium vulgare*.

| Extraits<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |     | Diamètres des zones d'inhibition (mm) |                  |                  |                |                     | Réf              |                  |
|----------------------------------|-----|---------------------------------------|------------------|------------------|----------------|---------------------|------------------|------------------|
|                                  |     | <i>E. coli</i>                        | <i>P. aerugi</i> | <i>S. aureus</i> | <i>K. pneu</i> | <i>P. mirabilis</i> |                  | <i>B. aureus</i> |
| <b>FLV</b>                       |     | 22 $\pm$ 1,285                        | 30 $\pm$ 1,729   | 00 $\pm$ 00      | 38 $\pm$ 1,014 | 32 $\pm$ 0,577      | -                | <b>[42]</b>      |
| <b>FLV</b>                       | ½   | 12 $\pm$ 1,721                        | 34 $\pm$ 1,418   | 12 $\pm$ 1,985   | 34 $\pm$ 0,550 | 36 $\pm$ 0,404      | -                |                  |
| <b>FLV</b>                       | ¼   | 12 $\pm$ 1,721                        | 40 $\pm$ 2,571   | 14 $\pm$ 2,076   | 32 $\pm$ 0,901 | 38 $\pm$ 2,042      | -                |                  |
| <b>TAN</b>                       |     | 22 $\pm$ 0,173                        | 30 $\pm$ 2,594   | 14 $\pm$ 2,291   | 34 $\pm$ 2,466 | 32 $\pm$ 0,577      | -                |                  |
| <b>TAN</b>                       | ½   | 14 $\pm$ 1,154                        | 28 $\pm$ 2,081   | 08 $\pm$ 0,858   | 28 $\pm$ 1,527 | 34 $\pm$ 3,785      | -                |                  |
| <b>TAN</b>                       | ¼   | 04 $\pm$ 0,50                         | 40 $\pm$ 2,163   | 10 $\pm$ 1,995   | 28 $\pm$ 04    | 28 $\pm$ 2,516      | -                |                  |
| <b>TE<sub>BR</sub></b>           | 100 | 12,50 $\pm$ 2,12                      | -                | -                | -              | 11,50 $\pm$ 2,12    | 31,65 $\pm$ 2,33 | <b>[114]</b>     |
|                                  | 80  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 18,50 $\pm$ 2,12 |                  |
|                                  | 60  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 14,50 $\pm$ 0,70 |                  |
|                                  | 40  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 13,8 $\pm$ 3,95  |                  |
|                                  | 20  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 7,50 $\pm$ 2,12  |                  |
| <b>TE<sub>HX</sub></b>           | 100 | 12,25 $\pm$ 1,06                      | -                | -                | -              | 13 $\pm$ 1,41       | 24,80 $\pm$ 2,54 |                  |
|                                  | 80  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 21 $\pm$ 1,41    |                  |
|                                  | 60  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 9,50 $\pm$ 3,53  |                  |
|                                  | 40  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 00 $\pm$ 00      |                  |
|                                  | 20  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 00 $\pm$ 00      |                  |
| <b>TE<sub>CH</sub></b>           | 100 | 13,50 $\pm$ 2,12                      | -                | -                | -              | 16,25 $\pm$ 1,76    | 31,50 $\pm$ 2,12 |                  |
|                                  | 80  | 0000                                  | -                | -                | -              | 0000                | 23 $\pm$ 2,82    |                  |
|                                  | 60  | 0000                                  | -                | -                | -              | 0000                | 16,50 $\pm$ 3,53 |                  |
|                                  | 40  | 0000                                  | -                | -                | -              | 0000                | 8 $\pm$ 1,41     |                  |
|                                  | 20  | 0000                                  | -                | -                | -              | 0000                | 00 $\pm$ 00      |                  |
| <b>TE<sub>AC</sub></b>           | 100 | 21,50 $\pm$ 4,94                      | -                | -                | -              | 11,66 $\pm$ 1,52    | 31,65 $\pm$ 2,33 |                  |
|                                  | 80  | 15,80 $\pm$ 2,54                      | -                | -                | -              | 0000                | 21,50 $\pm$ 2,12 |                  |
|                                  | 60  | 0000                                  | -                | -                | -              | 0000                | 17 $\pm$ 2,82    |                  |
|                                  | 40  | 0000                                  | -                | -                | -              | 0000                | 13 $\pm$ 2,82    |                  |
|                                  | 20  | 0000                                  | -                | -                | -              | 0000                | 9,50 $\pm$ 0,70  |                  |
| <b>TE<sub>AQ</sub></b>           | 100 | 21,30 $\pm$ 2,4                       | -                | -                | -              | 15,16 $\pm$ 1,64    | 31,50 $\pm$ 3,53 |                  |
|                                  | 80  | 15,80 $\pm$ 2,54                      | -                | -                | -              | 9,83 $\pm$ 1,17     | 24 $\pm$ 1,41    |                  |
|                                  | 60  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 9 $\pm$ 2,82     |                  |
|                                  | 40  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 00 $\pm$ 00      |                  |
|                                  | 20  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 00 $\pm$ 00      |                  |
| <b>ME<sub>BR</sub></b>           | 100 | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 26,98 $\pm$ 1,86 |                  |
|                                  | 80  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 00 $\pm$ 00      |                  |
|                                  | 60  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 00 $\pm$ 00      |                  |
|                                  | 40  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 00 $\pm$ 00      |                  |
|                                  | 20  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 00 $\pm$ 00      |                  |
| <b>ME<sub>HX</sub></b>           | 100 | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 34,30 $\pm$ 1,83 |                  |
|                                  | 80  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 22,30 $\pm$ 5,23 |                  |
|                                  | 60  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 00 $\pm$ 00      |                  |
|                                  | 40  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 00 $\pm$ 00      |                  |
|                                  | 20  | 00 $\pm$ 00                           | -                | -                | -              | 00 $\pm$ 00         | 00 $\pm$ 00      |                  |

**Tableau (III.11) (suite) :** Activité antibactérienne des extraits organiques et aqueux de *Marrubium vulgare*.

|                        |      | Diamètres des zones d'inhibition (mm) |                  |                  |                |                     |                  |              |
|------------------------|------|---------------------------------------|------------------|------------------|----------------|---------------------|------------------|--------------|
| Extraits (µg/ml)       |      | <i>E. coli</i>                        | <i>P. aerugi</i> | <i>S. aureus</i> | <i>K. pneu</i> | <i>P. mirabilis</i> | <i>B. aureus</i> | Réf          |
| <b>ME<sub>CH</sub></b> | 100  | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 26,50±2,12       | <b>[114]</b> |
|                        | 80   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 20,33±0,95       |              |
|                        | 60   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 8,66±0,94        |              |
|                        | 40   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
|                        | 20   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
| <b>ME<sub>AC</sub></b> | 100  | 16,33±0,94                            | -                | -                | -              | 14,63±0,35          | 33,30±1,62       | <b>[114]</b> |
|                        | 80   | 11,58±1,30                            | -                | -                | -              | 00±00               | 28,65±0,49       |              |
|                        | 60   | 8,83±1,17                             | -                | -                | -              | 00±00               | 13,50±2,12       |              |
|                        | 40   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 8,33±0,94        |              |
|                        | 20   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
| <b>ME<sub>AQ</sub></b> | 100  | 17,66±1,52                            | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            | <b>[114]</b> |
|                        | 80   | 14,66±0,57                            | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
|                        | 60   | 11,50±0,50                            | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
|                        | 40   | 10,11±1,16                            | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
|                        | 20   | 9,05±0,42                             | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
| <b>SE<sub>BR</sub></b> | 100  | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 25,20±1,31       | <b>[114]</b> |
|                        | 80   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
|                        | 60   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
|                        | 40   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
|                        | 20   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
| <b>SE<sub>HX</sub></b> | 100  | 10,66±1,52                            | -                | -                | -              | 27,52±2,50          | 27,53±2,50       | <b>[114]</b> |
|                        | 80   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 23,33±1,52          | 23,33±1,52       |              |
|                        | 60   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 17,66±1,15          | 17,66±1,15       |              |
|                        | 40   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 13,50±1,80          | 13,50±1,80       |              |
|                        | 20   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 9,16±0,76           | 9,16±0,76        |              |
| <b>SE<sub>CH</sub></b> | 100  | 00±00                                 | -                | -                | -              | 26,10±1,15          | 26,10±1,15       | <b>[114]</b> |
|                        | 80   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 19,50±2,29          | 19,50±2,29       |              |
|                        | 60   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 9,22±0,69           | 9,22±0,69        |              |
|                        | 40   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
|                        | 20   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
| <b>SE<sub>AC</sub></b> | 100  | 16,66±1,52                            | -                | -                | -              | 24,16±0,76          | 24,16±0,76       | <b>[114]</b> |
|                        | 80   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 19,55±1,26          | 19,55±1,26       |              |
|                        | 60   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 15,50±1,50          | 15,50±1,50       |              |
|                        | 40   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
|                        | 20   | 00±00                                 | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
| <b>SE<sub>AQ</sub></b> | 100  | 18,16±1,25                            | -                | -                | -              | 28,33±2,88          | 28,33±2,88       | <b>[114]</b> |
|                        | 80   | 14,38±0,96                            | -                | -                | -              | 20,48±3,236         | 24,83±2,36       |              |
|                        | 60   | 11,73±0,64                            | -                | -                | -              | 18,22±1,34          | 18,22±1,34       |              |
|                        | 40   | 9,16±0,76                             | -                | -                | -              | 15,11±1,04          | 15,11±1,01       |              |
|                        | 20   | 7,50±0,86                             | -                | -                | -              | 00±00               | 00±00            |              |
| <b>E<sub>MET</sub></b> | Brut | 12±0,3                                | 9±0,1            | 16±0,7           | -              | -                   | -                | <b>[21]</b>  |

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

Les diamètres des zones d'inhibition des flavonoïdes et des tanins [42] sont compris entre 4 et 40 mm vis-à-vis aux souches bactériennes testées.

Une forte activité antibactérienne a été marquée par les flavonoïdes et les tanins (zone d'inhibition  $\geq 28$ mm) contre *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *P. mirabilis* et une activité faible à modérée (zone d'inhibition  $\geq 4$ mm) contre *E. coli* et *S. aureus*.

Les extraits flavonoïdiques du mont de Tessala [114] sont les plus actives contre les souches testées, suivie par celles de la forêt de M'sila et Ain Skhouna respectivement.

Les trois extraits TE<sub>Cr</sub>, TE<sub>Ch</sub>, TE<sub>AC</sub> présentent des diamètres d'inhibition les plus élevés contre *B. aureus* (zone d'inhibition  $\geq 31,50$  mm). De plus, les extraits TE<sub>AC</sub> et TE<sub>aq</sub> induit une meilleure sensibilité contre *E. coli* (zone d'inhibition  $\geq 21,30$  mm). Les extraits ME<sub>HX</sub> et ME<sub>AC</sub> notent une activité antibactérienne élevée contre *B. aureus* (zone d'inhibition  $\geq 33$  mm) et une activité modérée pour les deux extraits ME<sub>Cr</sub> et ME<sub>Ch</sub> (zone d'inhibition  $\geq 26$  mm). Par contre, l'extrait aqueux ME<sub>aq</sub> n'enregistre aucune sensibilité contre *P. mirabilis* et *B. aureus*, mais il présente une activité modérée (zone d'inhibition  $\geq 16$  mm) contre *E. coli*.

Pour les extraits d'Ain Skhouna, ils présentent une bonne efficacité inhibitrice (zone d'inhibition  $\geq 24$ mm) contre *P. mirabilis* et *B. aureus* et action modéré (zone d'inhibition  $\geq 10$ mm) contre *E. coli*.

L'extrait méthanolique brut E<sub>Met</sub> [21] induit une faible activité antibactérienne contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

Tableau (III.12) : Activité antifongique des extraits organique de *Marrubium vulgare*.

| Extraits ( $\mu\text{g/ml}$ ) |               | <i>C. albicans</i> | <i>A. niger</i>  | Réf  |
|-------------------------------|---------------|--------------------|------------------|------|
| <b>FLV</b>                    | Solution mère | 09 $\pm$ 0,11      | 12 $\pm$ 0,34    | [42] |
| <b>TAN</b>                    | Solution mère | 13 $\pm$ 0,23      | 19 $\pm$ 0,30    |      |
| <b>TE<sub>BR</sub></b>        | 100           | 261,41             | 31,16 $\pm$ 1,64 | [39] |
|                               | 80            | 00 $\pm$ 00        | 26,33 $\pm$ 1,88 |      |
|                               | 60            | 00 $\pm$ 00        | 24 $\pm$ 7,93    |      |
|                               | 40            | 00 $\pm$ 00        | 22,66 $\pm$ 2,51 |      |
|                               | 20            | 00 $\pm$ 00        | 9,66 $\pm$ 1,55  |      |
| <b>TE<sub>HX</sub></b>        | 100           | 262 $\pm$ 1,05     | 18,83 $\pm$ 2,54 |      |
|                               | 80            | 24 $\pm$ 1,41      | 15,75 $\pm$ 1,76 |      |
|                               | 60            | 19,86 $\pm$ 0,80   | 8,5 $\pm$ 1,70   |      |
|                               | 40            | 9,16 $\pm$ 1,64    | 00 $\pm$ 00      |      |
|                               | 20            | 00 $\pm$ 00        | 00 $\pm$ 00      |      |
| <b>TE<sub>CH</sub></b>        | 100           | 28,30 $\pm$ 2,45   | 33,5 $\pm$ 3,53  |      |
|                               | 80            | 22,5 $\pm$ 2,12    | 26 $\pm$ 5,12    |      |
|                               | 60            | 00 $\pm$ 00        | 22 $\pm$ 1,41    |      |
|                               | 40            | 00 $\pm$ 00        | 9,49 $\pm$ 1,64  |      |
|                               | 20            | 00 $\pm$ 00        | 00 $\pm$ 00      |      |
| <b>TE<sub>AC</sub></b>        | 100           | 36,65 $\pm$ 4,73   | 37,5 $\pm$ 3,53  |      |
|                               | 80            | 27,5 $\pm$ 3,53    | 28,5 $\pm$ 4,95  |      |
|                               | 60            | 24 $\pm$ 1,41      | 25,5 $\pm$ 6,36  |      |
|                               | 40            | 18 $\pm$ 1,41      | 22,5 $\pm$ 3,53  |      |
|                               | 20            | 9,83 $\pm$ 1,17    | 8,99 $\pm$ 0,94  |      |
| <b>TE<sub>AQ</sub></b>        | 100           | IT                 | 25,8 $\pm$ 2,12  |      |
|                               | 80            | IT                 | 22 $\pm$ 1,41    |      |
|                               | 60            | IT                 | 9,49 $\pm$ 0,23  |      |
|                               | 40            | IT                 | 00 $\pm$ 00      |      |
|                               | 20            | IT                 | 00 $\pm$ 00      |      |
| <b>SE<sub>BR</sub></b>        | 100           | 24,45 $\pm$ 1,62   | IT               |      |
|                               | 80            | 20,25 $\pm$ 1,06   | IT               |      |
|                               | 60            | 15,5 $\pm$ 2,12    | IT               |      |
|                               | 40            | 10,5 $\pm$ 0,70    | IT               |      |
|                               | 20            | 8,83 $\pm$ 1,17    | IT               |      |
| <b>SE<sub>HX</sub></b>        | 100           | 28,36 $\pm$ 2,61   | 29,15 $\pm$ 6,86 |      |
|                               | 80            | 20,83 $\pm$ 1,65   | 22,3 $\pm$ 2,40  |      |
|                               | 60            | 8,22 $\pm$ 1,34    | 16,5 $\pm$ 2,12  |      |
|                               | 40            | 00 $\pm$ 00        | 00 $\pm$ 00      |      |
|                               | 20            | 00 $\pm$ 00        | 00 $\pm$ 00      |      |
| <b>SE<sub>CH</sub></b>        | 100           | 29 $\pm$ 1,41      | 24 $\pm$ 1,41    | [39] |
|                               | 80            | 18,3 $\pm$ 1,83    | 8,66 $\pm$ 0,94  |      |
|                               | 60            | 00 $\pm$ 00        | 00 $\pm$ 00      |      |
|                               | 40            | 00 $\pm$ 00        | 00 $\pm$ 00      |      |

Tableau (III.12) (suite) : Activité antifongique des extraits organique de *Marrubium vulgare*.

| Extraits (µg/ml)       |      | <i>C. albicans</i> | <i>A.niger</i> | Réf   |
|------------------------|------|--------------------|----------------|-------|
| <b>SE<sub>CH</sub></b> | 20   | 00±00              | 00±00          | [39]  |
| <b>SE<sub>AC</sub></b> | 100  | 24,5±2,12          | 32±2,82        | [39]  |
|                        | 80   | 19,75±1,76         | 28±1,41        |       |
|                        | 60   | 16,33±1,88         | 22,25±1,76     |       |
|                        | 40   | 9,16±1,18          | 13,83±1,65     |       |
|                        | 20   | 00±00              | 00±00          |       |
| <b>SE<sub>AQ</sub></b> | 100  | 9,05±1,23          | 29,43±2,5      |       |
|                        | 80   | 00±00              | 21,66±2,08     |       |
|                        | 60   | 00±00              | 8,83±2,36      |       |
|                        | 40   | 00±00              | 00±00          |       |
|                        | 20   | 00±00              | 00±00          |       |
| <b>ME<sub>BR</sub></b> | 100  | 23,05±1,73         | 28,1±1,01      |       |
|                        | 80   | 15,11±1,76         | 24,5±1,32      |       |
|                        | 60   | 00±00              | 00±00          |       |
|                        | 40   | 00±00              | 00±00          |       |
|                        | 20   | 00±00              | 00±00          |       |
| <b>ME<sub>HX</sub></b> | 100  | 28,16±0,76         | IT             |       |
|                        | 80   | 19,88±1,17         | IT             |       |
|                        | 60   | 15,10±1,50         | IT             |       |
|                        | 40   | 11,22±1,34         | IT             |       |
|                        | 20   | 8,38±1,33          | IT             |       |
| <b>ME<sub>CH</sub></b> | 100  | 26,93±1,40         | 30,16±1,60     |       |
|                        | 80   | 17,72±1,18         | 22,26±1,16     |       |
|                        | 60   | 00±00              | 16,22±0,69     |       |
|                        | 40   | 00±00              | 8,5±1,32       |       |
|                        | 20   | 00±00              | 00±00          |       |
| <b>ME<sub>AC</sub></b> | 100  | 26,22±1,07         | IT             |       |
|                        | 80   | 15,33±1,25         | IT             |       |
|                        | 60   | 00±00              | IT             |       |
|                        | 40   | 00±00              | IT             |       |
|                        | 20   | 00±00              | IT             |       |
| <b>ME<sub>AQ</sub></b> | 100  | 32,71,66           | 23,5±1,80      |       |
|                        | 80   | 15,5±1,32          | 18,22±1,07     |       |
|                        | 60   | 9,16±0,76          | 14,83±1,44     |       |
|                        | 40   | 00±00              | 10,88±0,83     |       |
|                        | 20   | 00±00              | 8,16±0,76      |       |
| <b>E<sub>MET</sub></b> | Brut | 10±01              | -              | [101] |

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

Les résultats de l'activité antifongique montrés dans le tableau (III.12) révèlent que les flavonoïdes et les tanins exercent une activité faible à modérée contre les deux souches fongiques testées *C. albicans* et *A. niger*.

Les extraits TE<sub>Br</sub> et TE<sub>Hx</sub> du mont de Tessala enregistrent une forte activité antifongique (zone d'inhibition  $\geq 261$  mm) contre *C. albicans* et faible à modérée (zone d'inhibition  $\geq 8,5$  mm) contre *A. niger*. L'extrait aqueux TE<sub>aq</sub> montre une inhibition totale de *C. albicans* et modérément (zone d'inhibition  $\geq 9,49$  mm) contre *A. niger*.

L'extrait SE<sub>Br</sub> est très efficace (inhibition totale) contre *A. niger* et modérément efficace contre *C. albicans*. Les extraits SE<sub>Hx</sub>, SE<sub>Ch</sub> et SE<sub>aq</sub> ont une forte activité antifongique contre les deux souches étudiées.

Les extraits de feuilles de la forêt de M'sila montrent une bonne efficacité (zone d'inhibition comprise entre 8,16 mm et 32,71 mm) contre les deux souches fongiques testées et, surtout l'extrait ME<sub>Hx</sub> et ME<sub>AC</sub> qui notent une inhibition totale contre *A. niger*.

L'extrait méthanolique brut présente une activité antifongique modérée contre *C. albicans* (zone d'inhibition  $\geq 10$  mm).

On peut conclure donc que, la variation de l'activité antimicrobienne des extraits de *Marrubium vulgare* contre les souches bactériennes et fongiques est directement due aux concentrations des flavonoïdes qui dépendent de la variation saisonnière. Ils sont plus élevés à la période de végétation que de la période de floraison.

## *Conclusion générale*

## Conclusion générale

Le présent travail se synthèse sur *Marrubium vulgare* L., c'est une tentative, sur le profil phytochimique et pour résumer des résultats pharmacologiques de cette espèce importante. Une myriade de données phytochimiques, pharmacologiques et des métabolites secondaires de *M. vulgare* isolés de diverses parties ont été publiés.

La littérature existante a montré que les parties aériennes de *M. vulgare* sont largement étudiées *in vitro* et *in vivo* contre diverses affections, principalement le cancer, l'hypertension et les maladies inflammatoires. Les diterpénoïdes, les flavonoïdes et les phénylpropanoïdes sont les principaux constituants chimiques qui ont été mis en évidence chez *M. vulgare*. La marrubiine est un des principaux diterpènes labdane existé également en forte concentration dans d'autres espèces de Lamiacées traditionnellement importantes qui ont été démontré d'excellentes propriétés pharmacologiques avec des marges de sécurité élevées. Elle est également considérée comme un substrat biosynthétique potentiel pour d'autres composés actifs puissants, à savoir l'acide marrubiinique et le marrubénol. Les travaux signalés comprenant d'autres études pharmacologiques telles que l'activité analgésique, antinociceptive, l'effet antiédématogène, l'activité antispasmodique et anti-inflammatoire.

L'huile essentielle extraite de la partie aérienne de *M. vulgare* à générer des rendements en faibles quantités entre 0,02% et 0,36%, et une composition très variée.

Les constituants majoritaires de l'huile essentielle de *M. vulgare* sont les  $\beta$ -Bisabolène (2,5% à 43,4%), *Germacrène-D* (0,3% à 37,9%) et l'*Eugénol* (0,5% à 21,5%) ainsi que les hydrocarbures sesquiterpènes qui présentent la fraction prédominante dans la composition chimique de l'huile essentielle. Elle présente une valeur d'IC<sub>50</sub> très importante qui varie de 99 µg/ml à 480 µg/ml, cependant l'IC<sub>50</sub> des extraits organiques et aqueux varie de 20 µg/ml à 1390 µg/ml. Cette variation est relativement dépendante des zones géographiques et le moment de la collecte.

Le screening phytochimique a montré que les saponines, les tanins et les flavonoïdes sont les principaux métabolites secondaires présents dans la plante. Les parties aériennes de *M. vulgare* sont riche en polyphénols totaux (jusqu'à 254,68 mg EAG/ml d'extrait) et en flavonoïdes totaux (jusqu'à 25,78 mg EQ/ml d'extrait).

Cette richesse en principes actifs a permis à la plante d'acquérir une activité antibactérienne et antifongique importante contre plusieurs souches bactériennes Gram

positif, Gram négatif et des souches fongiques qui sont la cause de nombreuses maladies graves et infectieuses chez l'homme.

Pour bénéficier de ces propriétés biologiques et thérapeutiques des flavonoïdes de cette plante, de nombreuses études antérieures ont été réalisées entre autres des formulations pharmaceutiques et cosmétiques à savoir : des gélules à effet antidiabétiques, un gel destiné au bronzage et une lotion qui permet la pigmentation des cheveux.

En perspective, des améliorations supplémentaires sont nécessaires en raison de l'augmentation d'intérêt de la recherche sur *M. vulgare* notamment dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et d'agriculture.

# *Annexe*

## Chapitre II

### I.1. Extraction des composés phénoliques

#### I.1.1. Extraction par Soxhlet

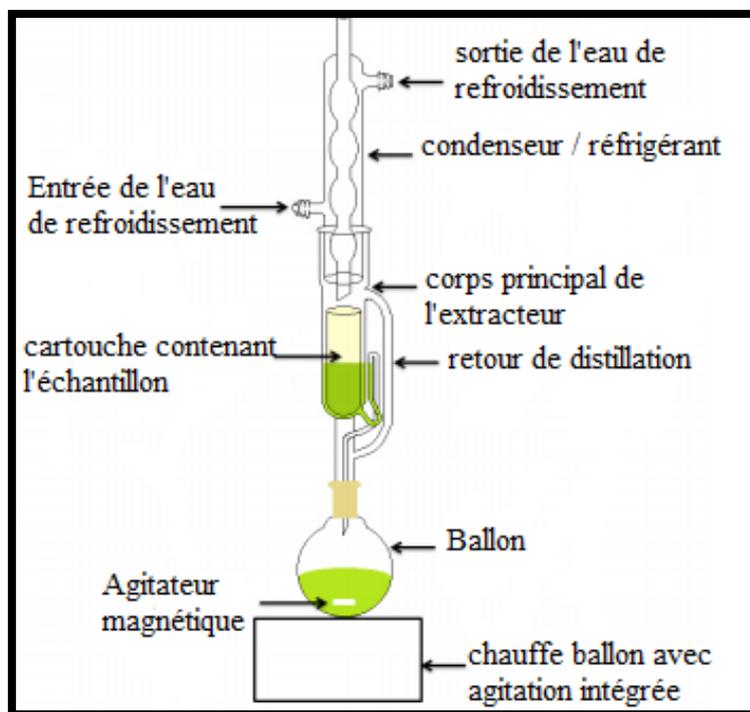


Figure I.1 : Schéma de montage de l'extraction en Soxhlet.

### I.2. Extraction par macération

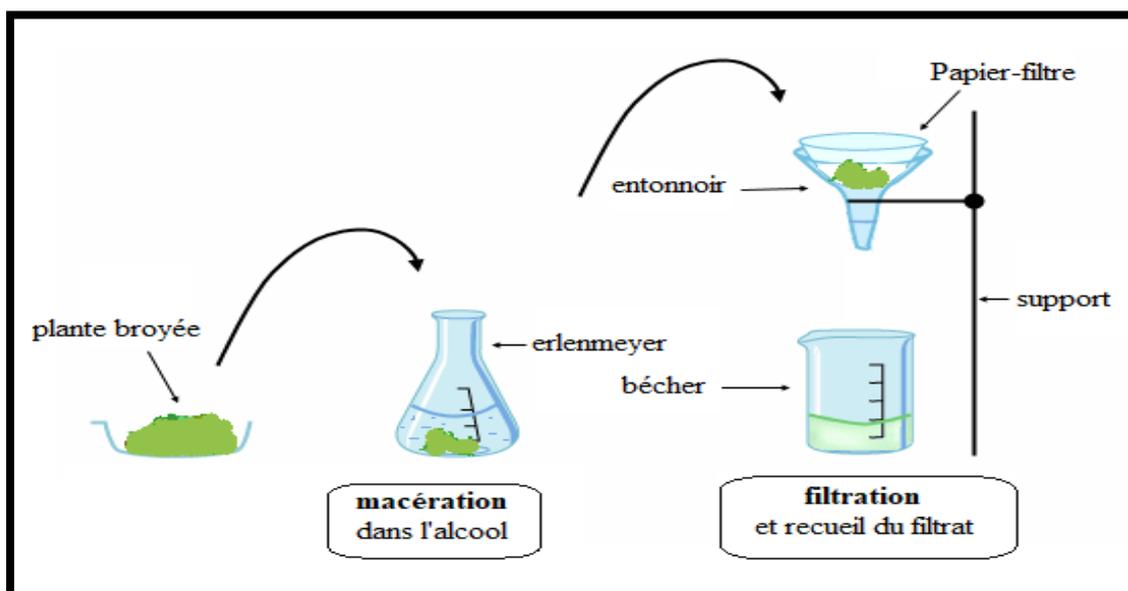


Figure I.2 : Etapes d'extraction par macération.

### **I.3. Extraction par décoction**



**Figure I.3 :** Extraction par macération.

## I.1.2. Extraction des huiles essentielles

### I.1.2.1. Extraction par hydrodistillation

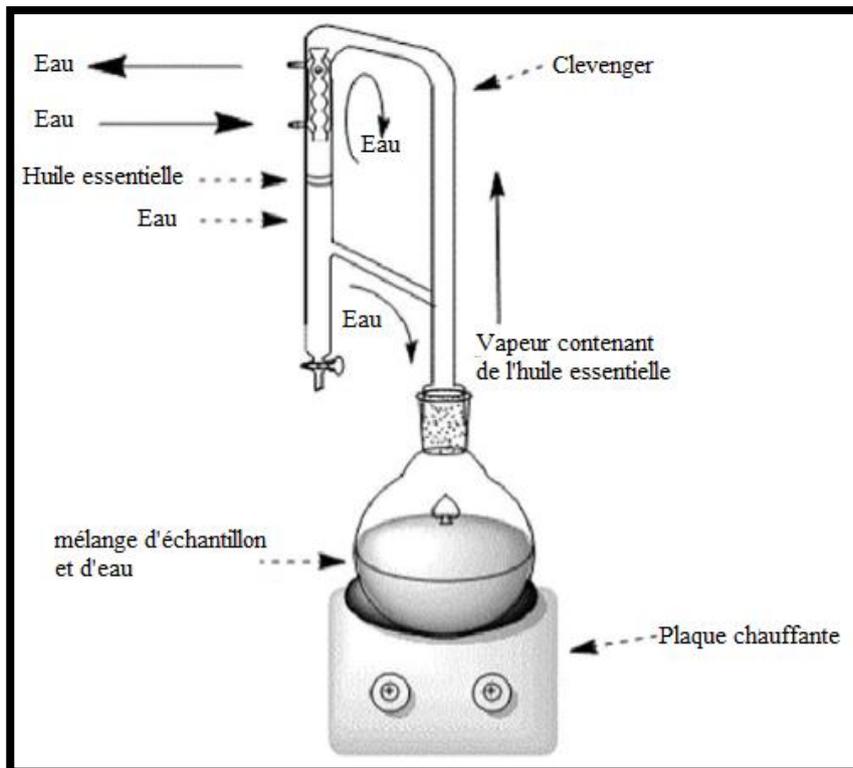


Figure I.4 : Schéma de montage de l'extraction par clewenger.

### I.1.2.2. Extraction par hydrodiffusion

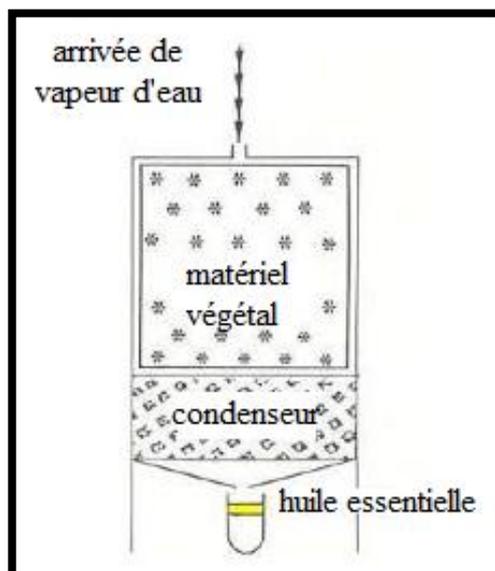


Figure I.5 : Schéma de montage d'hydrodiffusion.

### I.1.2.3. Extraction par expression à froid

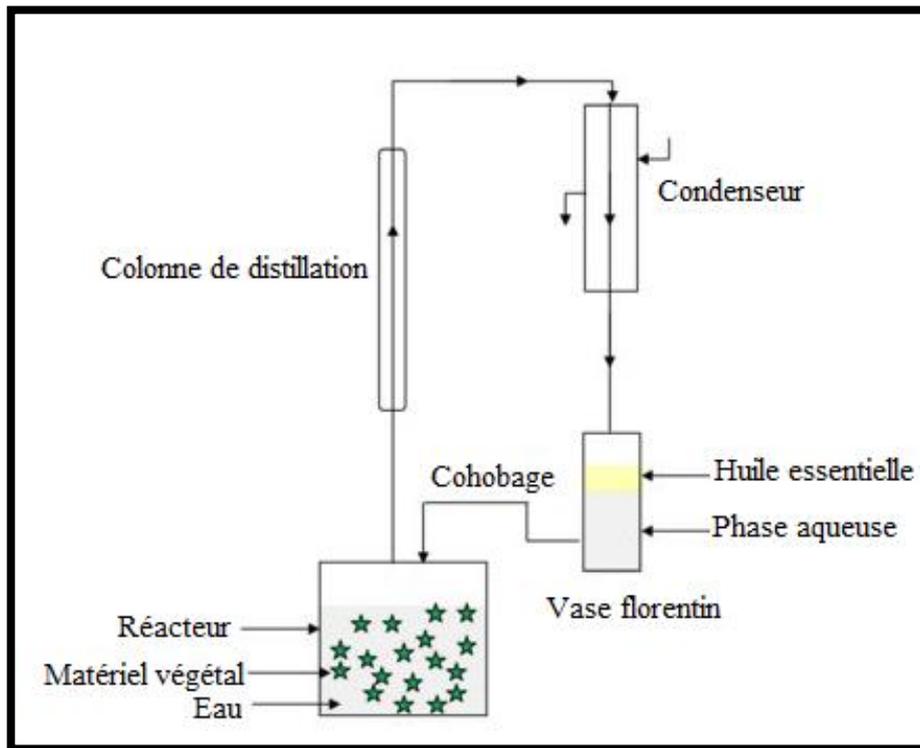


Figure I.6 : Schéma de montage de l'expression à froid.

### I.1.2.4. Extraction assistée par micro-ondes

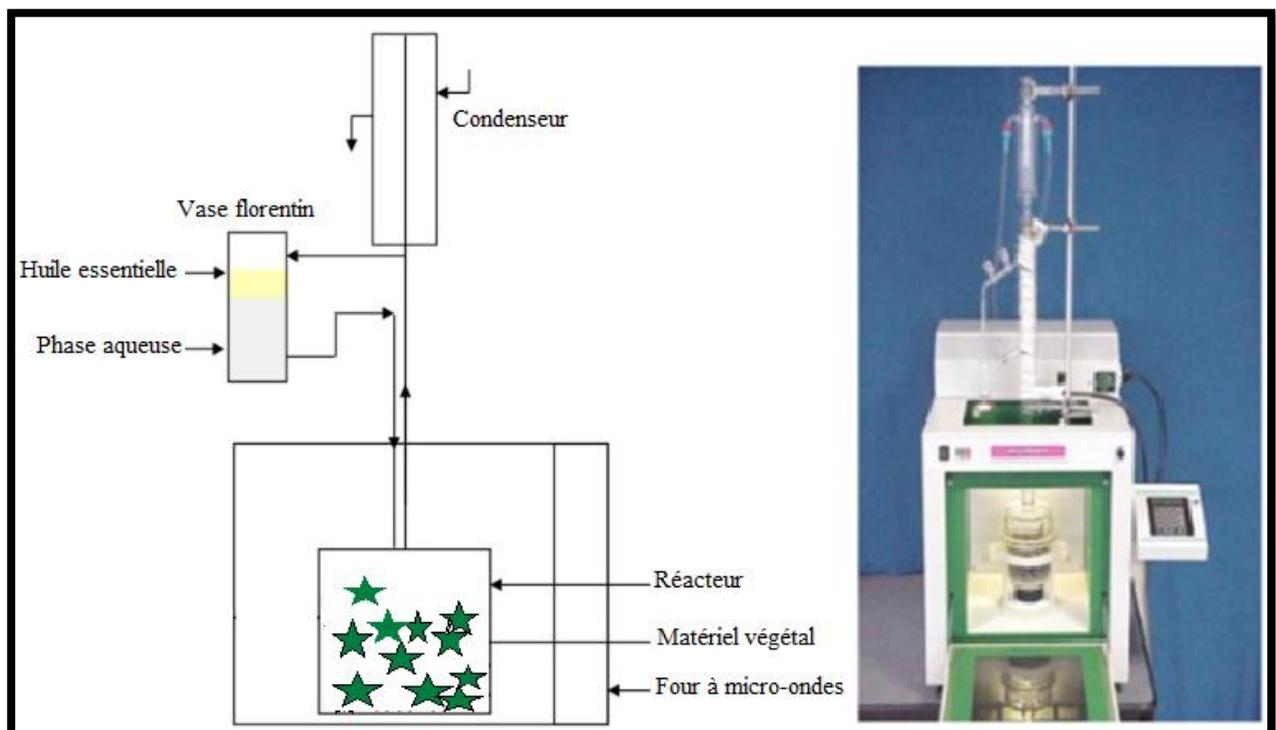


Figure I.7 : Extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME).

### I.1.2.5. Extraction par CO<sub>2</sub> supercritique

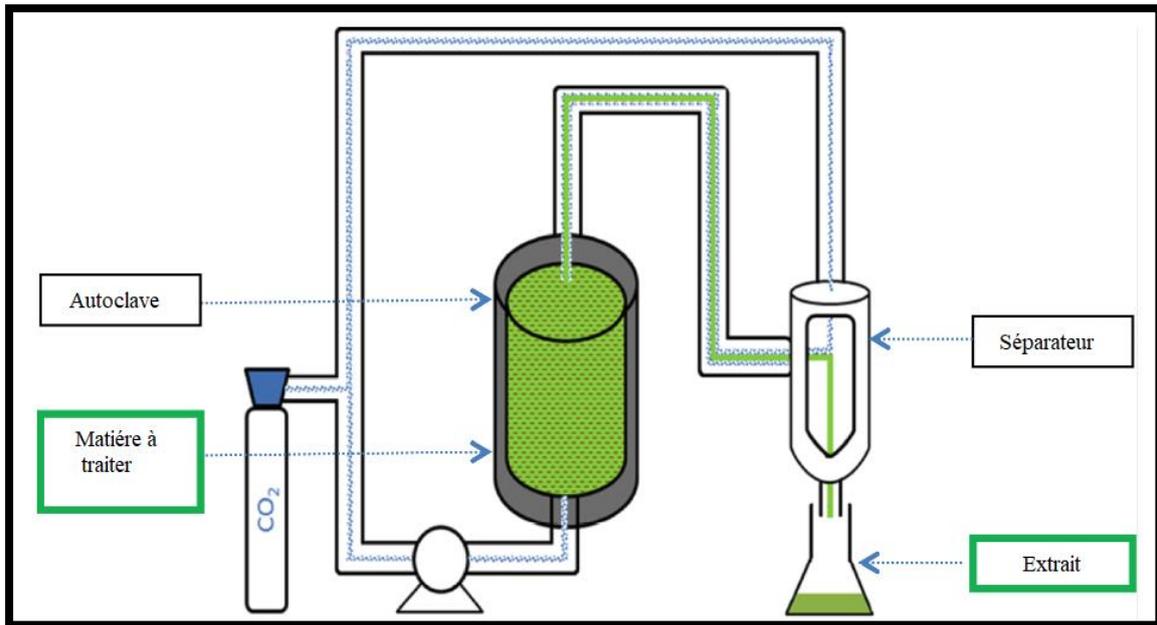


Figure I.8 : Schéma de montage d'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique.

### I.1.2.6. Extraction par enfleurage à froid

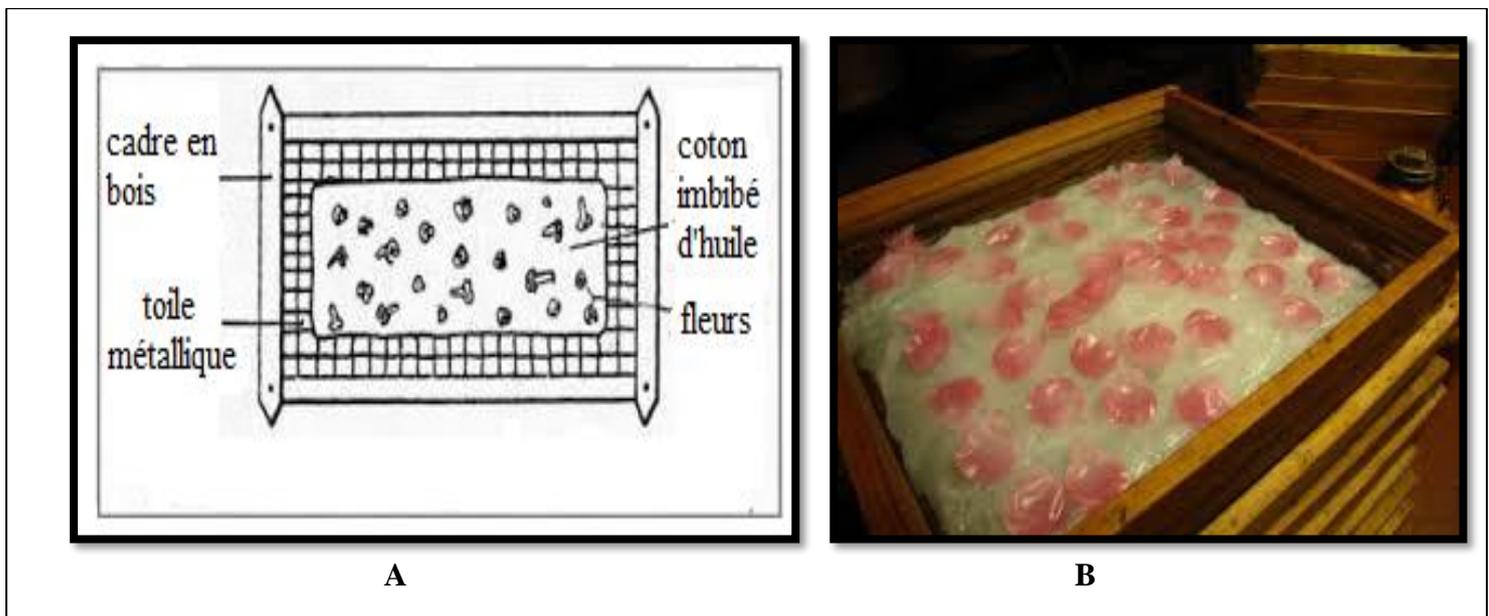


Figure I.9.A : Schéma de montage de l'extraction par enfleurage à froid.

Figure I.9.B : enfleurage à froid.



**Figure I.10:** Extraction par enfleurage à chaud.

## Chapitre III VII

### I.1. Activité antioxydant

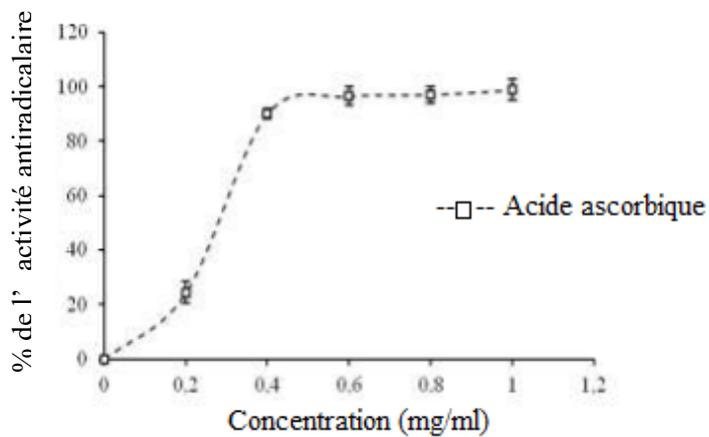


Figure I.1 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'acide ascorbique.

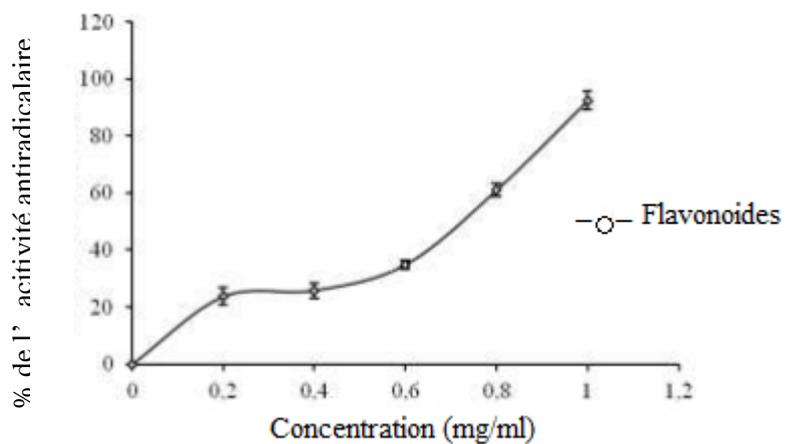
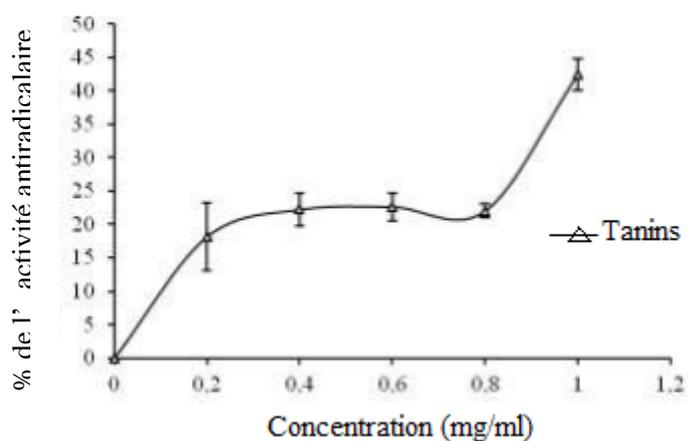


Figure I.2 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par les flavonoïdes de *Marrubium vulgare*.



**Figure I.3 :** Pourcentage d'inhibition de DPPH par les tanins de *Marrubium vulgare*.

## I.2. Préparation pharmaceutique à base de *Marrubium vulgare*

### Lotion pour promouvoir la pigmentation des cheveux

| Ingrédient                   |        |
|------------------------------|--------|
| Extrait méthanolique         | 0,15 g |
| Glycol de propylène          | 5 g    |
| Crèmophor RH ®40             | 1 g    |
| Ethanol                      | 30 g   |
| Excipient aqueux parfumé qsp | 100 g  |

### Mode d'emploi

La lotion est appliquée sur les cheveux à raison de 1ml deux fois par jour pendant 6 mois pour obtenir un effet pigmentant significatif.

## Gel pour favoriser le bronzage

Le gel est préparé à partir des deux phases A et B :

| <b>Ingrédient</b>            |       |
|------------------------------|-------|
| <b>1) Phase A</b>            |       |
| Extrait méthanolique         | 0,1 g |
| Malylytyrosine               | 2 g   |
| Glycol propylène             | 4 g   |
| Glycérol                     | 0,5 g |
| Crèmophor RH® 40             | 1 g   |
| Ethanol                      | 25 g  |
| Excipient aqueux parfumé qsp | 50 g  |
| <b>2) Phase B</b>            |       |
| 1,25% Carbopol 940 gel®      | 50 g  |

La phase A est ajoutée progressivement à la phase B et, les composants sont mélangés avec un mélangeur à hélice jusqu'à ce que la dispersion soit complète. Cela donne un gel pour favoriser le bronzage de la peau.

### Mode d'emploi

Le gel peut être appliqué avant ou pendant l'exposition au soleil.

### Gélule à effet hypoglycémiant

| <b>Ingrédient</b>                        |        |
|--|--------|
| Poudre de la plante séchée à l'air libre | 150 mg |

### Posologie

3 à 4 gélules 2 fois par jour.

## *Références bibliographiques*

- [1] W. Lewis & M. Elvin-Lewis, Medical botany: plants affecting human health. John Wiley & Sons, (2003).
- [2] A. Roger, « Energie Nucléaire », Edition Eyrolles, (2009).
- [3] R. Kuttan, KB. Harikumar, Espèces de Phyllanthus: évaluation scientifique et applications médicinales. CRC Press (2011).
- [4] M. Boukhatem, N., M. Hamaidi, F. Saidi, & Y. Hakim, Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature & Technology*, (3), 37. (2010).
- [5] S. Feknous, F. Saidi & R. Said, Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Nature & Technology*, (11), 7. (2014)
- [6] A. Sofowora, Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique (p 22). Edition Karthala (2010).
- [7] F. Couic-Marinié, Les huiles essentielles en pratique, administration et précautions d'emploi. *Actualités Pharmaceutiques*, 57(580), 26-29. (2018).
- [8] S. Lodhi, G. Vadnere, V. Sharma & M. Usman, *Marrubium vulgare* L.: A review on phytochemical and pharmacological aspects. *Journal of Complementary Medicine Research*, 6(4), 429-452. (2017).
- [9] J. Bruneton, Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. 2<sup>ème</sup> Ed : *TEC & DOC*. Paris. 337 p. (2001).
- [10] P. Crété, Précis de Botanique : Systématique des Angiospermes. Tome II. 2<sup>ème</sup> Ed: Masson, Paris. pp. 368-371. (1965).
- [11] M. Tabti, O. tahdjerit, « Étude taxonomique de quelques populations de *Salvia verbenaca* ssp. *Euverbenaca* et ssp. *clandestina* (Lamiaceae) du golfe de Bejaia et de la vallée de la soummam ». Mémoire de master, université Abderrahmane Mira de Bejaia, (2017).
- [12] D. Rigano, A. Apostolides, M. Bruno, C. Formisano, A. Grassia, S. Piacente, F. Piozzi, F. Senatore, Phenolic compounds of *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum* from Lebanon. *Biochemical Systematics and Ecology*. 34: 256-260. (2006).

- [13] S. Meyre, R. Yunes, V. Schlemper, F. Campos-Buzzi, V. Cechinel, Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). II Farmaco. 60: 321–326. (2005).
- [14] K. Bouterfas., Z. Mehdadi., A. Latreche., Z. Hazem., N. Bouredja. Quantification de quelques polyphénols de *Marrubium vulgare* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale) pendant les deux périodes de végétation et de floraison. Les technologies de laboratoire, 8(31).
- [15] J. Bellakhdar, Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires La pharmacopée marocaine traditionnelle, ibis Press. (1997).
- [16] L. Dellile, Les plantes médicinales d'Algérie, Bertie, p131-132. (2007).
- [17] M. Rombi, R. Dominique, 120 plantes médicinales, 2ème édition, Edition Alpen, p287, 288 ,289. (2007).
- [18] S. Aouadhi, Mémoire atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. (2010).
- [19] Amazon.fr, disponible sur <https://www.amazon.fr/Imprim%C3%A9-r%C3%A9tro-MARRUBIUM-VULGARE-marrube-blanc-Flora/dp/B015J7OINS>.
- Visité le 05/06/2020 à 20 :42
- [20] W. Judd, C. Campbell, E. Kellogg, P. Steven, Botanique systématique : Une perspective phylogénétique. 1ere Ed : Paris et Bruxelles. pp. 369-384. (2002).
- [21] A. Boudjelal, « Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie », Thèse de doctorat, Université de Annaba-Badji Mokhtar (2013).
- [22] G. Gilly, Les plantes aromatiques et les huiles essentielles à Grasse : botanique culture, chimie, production. L'Harmatan. Paris. P58. (2005).
- [23] G. Bonnier, & G. De Layens, Flore complète portative de la France, de la Suisse et de la Belgique : Pour trouver facilement les noms des plantes sans mots techniques. 5338 figures représentant les caractères de toutes les espèces. Avec une carte des régions de la France et une carte des régions de la Suisse. Belin. (1986).

- [24] A. Badiviane, Al moâjam al mosawir li asma al nabatat, Medbouli, p 38. (1996).
- [25] M. Ahvazi, G. Balali, Z. Jamzad, H. Saeidi, A Taxonomical, Morphological and Pharmacological Review of *Marrubium vulgare* L., An Old Medicinal Plant in Iran. *Journal of Medicinal Plants* 1(65), 7-24.
- [26] A. Guiet, « l'apport de *Marrubium vulgare* L., dans la prévention du risque cardiovasculaire », thèse de doctorat, université de France (2011).
- [27] V. Cechinel, *Marrubium vulgare* L., In Medicinal and Aromatic Plants of South America (pp. 317-321). Springer, Dordrecht. (2018).
- [28] S. Foster, & C. Hobbs, A field guide to western medicinal plants and herbs. Houghton Mifflin Harcourt. (2002).
- [29] V. Schlempher, « Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues ». *Phytomedicine*, 3 (2), 211-216. (1996).
- [30] V. Hammiche, Traitement de la toux à travers la pharmacopée traditionnelle kabyle. *Phytothérapie*, 13(6), 358-372. (2015).
- [31] A. Boudjlel, C. Henchiri, L. Siracusa, M. Sari, R. Giuseppe, Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion, *Fitoterapia* 83:p 286-292. (2012).
- [32] F. Baba Aissa, Encyclopédie des plantes médicinales, Rouïba : librairie moderne, p 168. (2000).
- [33] M. Wichtl, R. Anton, Plantes thérapeutiques : traditions, pratique officinale, sciences et thérapeutique. 2<sup>ème</sup>Ed: TEC & DOC. Paris. (2003).
- [34] H. Said-Al Ahl, A. Gendy, A. Mahmoud, et H. Mohamed, Composition en huile essentielle de *Marrubium vulgare* L., Cultivée en Egypte. *Journal international de recherche sur les plantes*, 1 (4), 138-141. (2015).
- [35] M. Masoodi, B. Ahmed, I. Zargar, S. Khan & P. Singh, Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *African journal of Biotechnology*, 7(2). (2008).
- [36] A. Matkowski, P. Tasarz, et E. Szypuła, Activité antioxydante d'extraits d'herbes de cinq plantes médicinales de Lamiaceae, sous-famille des Lamioideae. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (11), 321-330. (2008).

- [37] U. Albuquerque, U. Patil, et A. Máthé, *Plantes médicinales et aromatiques d'Amérique du Sud*. Springer Pays-Bas, (2018).
- [38] K. Bouterfas, Z. Mehdadi, L. Aouad, M. Elaoufi, M. Khaled, A. Latreche, & W. Benchiha, La localité d'échantillonnage influence-t-elle l'activité antifongique des flavonoïdes de *Marrubium vulgare* vis-à-vis de *Aspergillus niger* et *Candida albicans*?. *Journal de Mycologie Médicale*, 26(3), 201-211. (2016).
- [39] Z. Zarai, A. Kadri, I. Chobba, R. Mansour, A. Bekir, H. Mejdoub & N. Gharsallah, The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in health and disease*, 10(1), 161. (2011).
- [40] J. Rodríguez Villanueva, & J. Martín Esteban, An Insight into a Blockbuster Phytomedicine; *Marrubium vulgare* L. Herb. More of a Myth than a Reality?. *Phytotherapy Research*, 30(10), 1551-1558. (2016).
- [41] Assessment report on *Marrubium vulgare* L., herba. European Medicines Agency, 2013.
- [42] A. Boutlelis, «Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydant, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L », thèse de doctorat, Université de Annaba-Badji Mokhtar (2014).
- [43] F. Nsemi, « Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques », thèse de doctorat, université de LORRAINE, (2010).
- [44] R. Vijayakumar & S. Raja, *Secondary Metabolites: Sources and Applications*. BoD–Books on Demand. (2018).
- [45] K. Ramawat, & J. Mérillon, Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes (pp. 1541-2662). *Heidelberg, Germany: Springer*, (2013).
- [46] I. Urquiaga, F. Leighton, Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Laboratorio de Citología Bioquímica y Lípidos, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile. *Biol. Res.* vol.33 n.2 Santiago, (2000).
- [47] J. Bruneton, « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation », 3ème Ed, Lavoisier, Paris, 199-388-1120. (1999).

- [48] R. Malviya, V. Bansal, O. Pal & P. Sharma, High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of global pharma technology*, 2(5), 22-26. (2010).
- [49] E. Bamuza-Pemu, & E. Chirwa, E, Profile of aromatic intermediates of titanium dioxide mediated degradation of phenol. (2013).
- [50] Y. Dacosta Y, Les phyto-nutriments bioactifs. Edition Yves Dacosta. Paris, 317p. (2003).
- [51] D. Lin, M. Xiao, J. Zhao, Z. Li, B. Xing, X. Li,... & H. Chen, An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molécules*, 21(10), 1374. (2016).
- [52] K. Ghedira, Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169. (2005).
- [53] C. Combs, Tannins: Biochemistry, Food Sources and Nutritional Properties. Nova Science Publishers, (2016).
- [54] V. Paolini, Ph. Dorchies, H. Hoste, *Alter. Agri*, 2003, 17-19.
- [55] H. Makkar, P. Siddhuraju & K. Becker, Plant secondary metabolites (pp. 101-106). Totowa, NJ, USA: Humana Press, (2007).
- [56] A. Pictet, La constitution chimique des alcaloïdes végétaux. Masson, (1897).
- [57] F. Capasso, T. Gaginella, G. Grandolini & A. Izzo, *Phytotherapy: a quick reference to herbal medicine*. Springer Science & Business Media, (2003).
- [58] S. Benyhe, F. Zádor & F. Ötvös, Biochemistry of opioid (morphine) receptors: binding, structure and molecular modelling. *Acta Biologica Szegediensis*, 59(suppl. 1.), 17-37. (2015).
- [59] B. Pavan, A. Dalpiaz, L. Marani, S. Beggiato, L. Ferraro, D. Canistro... & L. De Fazio, Geraniol pharmacokinetics, bioavailability and its multiple effects on the liver antioxidant and xenobiotic-metabolizing enzymes. *Frontiers in pharmacology*, 9, 18. (2018).
- [60] E. Breitmaier, *Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*. John Wiley & Sons, (2006).
- [61] K. Hostettmann & A. Marston, *Saponins*. Cambridge University Press, (2005).
- [62] Ö. Güçlü-Üstündağ & G. Mazza, Saponins: properties, applications and processing. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(3), 231-258. (2007).

- [63] B. Gélébart, X. Duret & O. Lalonde, « Optimisation de l'extraction, en réacteur « Batch », de biomasse énergétique à l'aide d'émulsions ultrasoniques de solvants verts », Mémoire de maîtrise, Université Sherbrooke Canada.
- [64] M. Boukhatem, A. Ferhat & A. Kameli, Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : revue de littérature. Une, 3, 4.
- [65] W. Jones, & A. Kinghorn, Extraction of plant secondary metabolites. In Natural products isolation (pp. 323-351). Humana Press. (2006).
- [66] S. Handa, An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, 1. (2008).
- [67] J. Durvelle, Fabrication des essences et des parfums: plantes à parfum.-Extraction des essences et des parfums par distillation par expression et par les dissolvants. J. Fritsch. (1893).
- [68] C. Bicchi, E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini, L. Mondello, B. Zellner & P. Rubiolo, Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(6), 382-391. (2008).
- [69] M. Paris, M. Hurabielle, Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie, Tome I, édition Masson, (1981).
- [70] D. De Sousa, Bioactive essential oils and cancer. Springer, (2015).
- [71] D. Nagegowda, & N. Dudareva, Plant biochemistry and biotechnology of flavor compound and essential oils. *Med Plants Biotechnol From Basic Res Ind Applications*, 469-492. (2007).
- [72] Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (AFSSAPS). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. (Mai 2008).
- [73] P. Goetz, & K. Ghedira, Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles. In *Phytothérapie anti-infectieuse* (pp. 193-208). Springer, Paris. (2012).
- [74] J. Chalchat, L. Carry, C. Menut, G. Lamaty, R. Malhuret & J. Chopineau, Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.*; 9: 67-75. (1997).

- [75] R. Wijesekara, C. Ratnatunga, K. Durbeck, The distillation of essential oils. Manufacturing and plant Construction Handbook. Eschborn, Federal Republic of Germany, Protrade, Department of foodstuffs & Agricultural Products. (1997).
- [76] B. Benjilali, Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. *Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation*. 17-59. (2004).
- [77] F. Couic-Marinier, A. Lobstein, Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*; 52 (525) : 18-21. (2013).
- [78] H. Lamendin, Huiles essentielles en diffusion atmosphérique. *Chir. Dent. Fr*; 1185: 78-80. (2004).
- [79] J. Scheffer, Various methods for the isolation of essential oils. *Phytother. Res* ; 10 : S6-S7. (1996).
- [80] P. Belaiche, Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. L'aromatogramme Tome I, Edition Maloine. (1979).
- [81] J. France-Ida, Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info-essence 1996*; 3: 5-6.
- [82] G. Benalloul, Techniques de parfumerie à Grasse présentation historique. *Recherches régionales*, (196), 53. (2010).
- [83] E. Abou Zaid, Aromatic and medicinal plants—their agricultural and medicinal products. *El-Dar El-Arabia for Publishing*, Cairo. (1988).
- [84] D. Al fekaiki, Application of Gas chromatography mass Spectrometry (GC MS) in Food and Biotechnology. *Reaserchgate*. (2014).
- [85] A. Al-Rubaye, I. Hameed & M. Kadhim, Une revue: utilisations de la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC- MS) pour l'analyse des composés naturels bioactifs de certaines plantes. *Journal international de recherche toxicologique et pharmacologique*, 9 (1), 81-85. (2017).
- [86] S. Sutour, « Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats », thèse de doctorat, université de Corse Pascal Paoli, (2010).

- [87] X. Guardino, J. Albaigés, G. Firpo, R. Rodriguez-Vinals & M. Gassiot, Accuracy in the determination of the Kovats retention index: mathematical dead time. *Journal of Chromatography A*, 118(1), 13-22. (1976).
- [88] F. Lucaccioni, R. DENEYER & B. Tilquin, Pour une analyse des huiles essentielles. *Chimie nouvelle*, 11(43), 1253-1257. (1993).
- [89] J. Bélanger, J. Paré & M. Sigouin, High performance liquid chromatography (HPLC): principles and applications. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* (Vol. 18, pp. 37-59). Elsevier, (1997).
- [90] W. Elbali, A. Djouahri, Z. Djerrad, B. Saka, S. Aberrane, N. Sabaou,... & L. Boudarene, Chemical variability and biological activities of *Marrubium vulgare* L. essential oil, depending on geographic variation and environmental factors. *Journal of Essential Oil Research*, 30(6), 470-487. (2018).
- [91] A. Abadi & A. Hassani, Chemical composition of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Algeria. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 8(3), 210-214. (2013).
- [92] S. Rezazi, S. Hanini, M. SI, & S. Abdelmalek, Kinetic modeling and parameters identification based on metaheuristic optimization techniques for extraction process of *marrubium vulgare* L. essential oil. (2017).
- [93] R. Belhattab, « Composition chimique et propriétés antioxydantes, antifongiques et antiaflatoxinogènes d'extraits de *Origanum glandulosum* Desf. et *Marrubium vulgare* L., (famille des Lamiaceae) », thèse de doctorat, université FERHAT ABBAS de Sétif, (2018).
- [94] B. Hamdaoui, W. Wannes, M. Marrakchi, N. Brahim & B. Marzouk, Essential oil composition of two Tunisian horehound species: *Marrubium vulgare* L. and *Marrubium aschersonii* Magnus. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(5), 608-612. (2013).
- [95] A. Tabet Zatla, « Caractérisations chimiques et étude biologiques d'extraits de quatre plantes aromatiques" *Daucus. carota* ssp. *sativus*, *Marrubium vulgare*, *Ballota nigra* et *Cynoglossum cheirifolium*" de la région de Tlemcen », thèse de doctorat, université Aboubakr Belkaid Tlemcen, (2017).

- [96] H. Fadel, F. Benayache & S. Benayache, Antioxidant properties of four Algerian medicinal and aromatic plants *Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus phoenicea* L., *Marrubium vulgare* L. and *Cedrus atlantica* (Manetti ex Endl). (2016).
- [97] M. Aćimović, K. Jeremić, N. Salaj, N. Gavarić, B. Kiproviski, V. Sikora & T. Zeremski, *Marrubium vulgare* L.: A Phytochemical and Pharmacological Overview. *Molecules*, 25(12), 2898. (2020).
- [98] M. Seifi, « Caractérisation chimique et étude toxico-biologique de l'huile essentielle et de l'hydrolat du *Marrubium vulgare* de la région de Tlemcen », mémoire de master, université Aboubakr Belkaid Tlemcen, (2018).
- [99] K. Zahaf, M. Bahloul & A. Hazourli, «Etude phytochimique et évaluation de l'activité anticorrosion des extraits des plantes *Thapsia garganica* L. et *Marrubium vulgare* », mémoire de master université Larbi Ben M'hidi d'Oum El Bouaghi, (2019).
- [100] H. Mahdjouba, « Etude phytochimique de *Rosmarinus Officinalis* (L) et *Marrubium Vulgare* (L) (Aspect qualitatif) », mémoire de master, université Ziane Achour de Djelfa. (2015).
- [101] N. Amessis-Ouchemoukh, K. Madani, P. Falé, M. Serralheiro & M. Araújo, Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 53, 6-15. (2014).
- [102] G. Chafia, & M. Imen, « Effets antifongiques d'une plante médicinale *Marrubium vulgare* », mémoire de master Université 8 Mai 1945 Guelma, (2017).
- [103] M. Houazene, « Etude de l'activité antibactérienne des flavonoïdes et des tanins du marrube blanc et l'évaluation de l'activité antioxydant de l'extrait tannique », mémoire de master, UMMTO, (2017).
- [104] I. Namoune, B. Khettal, A. Assaf, S. Elhayek & L. Arrar, Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Organic and Aqueous Extracts of Northeast Algerian *Marrubium vulgare*. *Phytothérapie*, 16(S1), S119-S129. (2018).
- [105] N. Ghedadba, H. Bousselsela, L. Hambaba, S. Benbia & Y. Mouloud, Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*, 12(1), 15-24. (2014).

- [106] H. Ghazghazia, A. Chediab, M. Abderrazakb & H. Brahima, Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du nord de Tunisie. *Microbiol Hyg Alim*, 25(73), 37-41. (2013).
- [107] A. Laichaoui, « Caractérisation préliminaire d'une plante médicinale de marrube «*Marrubium vulgare* L.» pour son utilisation dans l'industrie alimentaire », mémoire de master, université M'hamed Bougara Boumerdes, (2016).
- [108] C. Sanchez-Moreno, Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int J Food Sci Technol* 8: 121–37. (2002).
- [109] C. Popovici, I. Saykova & B. Tylkowski, Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. (2010).
- [110] K. Bouterfas, Z. Mehdadi, M. Elaoufi, A. Latreche & W. Benchiha, Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. In *Annales Pharmaceutiques Francaises* (Vol. 74, No. 6, pp. 453-462). Elsevier Masson. (2016).
- [111] H. Boughendjioua, Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* cultivées dans la région de Skikda-Algérie. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Lavandula officinalis* grown in the region of Skikda-Algeria. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*.(2017).
- [112] J. Ganière, C. Mangion & M. Péridy, Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. *Revue de médecine vétérinaire*, 155(8-9), 411-416. (2004).
- [113] Y. Mouas, F. Benrebiha & C. Chaouia, Evaluation de l'activité antibacterienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *Rosmarinus officinalis* L. *Revue Agrobiologia*, 7(1), 363-370. (2017).
- [114] K. Bouterfas, Z. Mehdadi, M. Elaoufi, L. Aouad, A. Latreche & W. Benchiha, In vitro antibacterial activity of flavonoids extracts from three Algerian horehound (*Marrubium vulgare* L.) leaves. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18(1), 59-66. (2018).