



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et  
de la vie Département des sciences de la matière  
Domaine des sciences de la matière  
Filière de chimie

# MÉMOIRE DE MASTER

Chimie pharmaceutique

---

Présenté et soutenu par :  
**Abba Mohamed amine**

Le :

## Etude phytochimique de la plante *Marrubium vulgare*

---

Jury :

Mme BOUBEKRI Cherifa	Pr	Université de Biskra	Présidente
Mme KHMAOULI Saida	MCA	Université de Biskra	Examinatrice
Mr BENAÏCHA Rachid	MCB	Université de Biskra	Rapporteur

## **Remerciement**

*Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*Je tiens particulièrement à remercier mon promoteur, BENAKCHA RACHID pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, je le remercie pour sa disponibilité, sa patience et ses conseils et de m'avoir guidé durant la préparation de mon mémoire de master.*

*Je remercie mesdames les membres du jury :*

*Pr. BOUBEKRI Cherifa et Dr.KHEMOULI Saida d'avoir accepté de lire ce manuscrit.*

*Je remercie tous les enseignants, les étudiants et les travailleurs de l'université de Biskra et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma formation pédagogique et scientifique. Je remercie tous ceux et celles qui m'ont marqué par leur soutien et encouragements et je leur exprime mon respect et ma profonde*

# Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des schémas

Liste des abréviations et symboles

Introduction générale..... 1

CHAPITRE I..... 1

GENERALITES SUR LES FLAVONOIDES..... 1

I.1. Introduction ..... 2

I.2. Définition ..... 2

I.3. Structure chimique ..... 3

I.4. Classification ..... 3

I.4.1. Les flavones ..... 4

I.4.2. Les flavonols ..... 5

I.4.3. Les flavanols ..... 5

I.4.4. Les flavanones ..... 5

I.4.5. Les isoflavones ..... 5

I.4.6. Les anthocyanidines ..... 6

I.5. Distribution et localisation..... 6

I.6. Facteurs affectant la coloration ..... 7

I.6.1. Acidité (pH) ..... 7

I.6.2 . Degré d'hydroxylation du cycle B ..... 7

I.7 . Activités biologiques des flavonoïdes ..... 7

I.7.1. Propriétés antioxydantes et piègeurs de radicaux libres ..... 7

I.7.2. Propriétés inhibitrices d'enzymes ..... 8

I.7.3. Effets protecteurs vasculaires ..... 8

I.7.4. Propriétés antihépatotoxiques ..... 8

I.7.5. Propriétés antiallergiques ..... 9

I.7.6. Activité anti-inflammatoire .....	9
I.7.7. Activité anti-ulcérogène .....	9
I.7.8. Autres effets biologiques .....	10
I.8. La biosynthèse des flavonoïdes .....	10
1.9. La biodisponibilité des flavonoïdes .....	11
I.10. Intérêts des flavonoides .....	12
I.10.1. Fonctions au niveau du producteur.....	12
I.10.2. Actions pharmacologiques.....	13
<b>CHAPITRE II.....</b>	<b>15</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIE SUR LA PLANTE.....</b>	<b>15.</b>
II.1.Introducton .....	16
II.2. Généralités sur la plante .....	16
II.2.1. Famille des Lamiacées .....	16
II.2.3. sous Espèce de Marrubium vulgare .....	17
II.2.4. Usage thérapeutique .....	19
<b>CHAPITRE III .....</b>	<b>21</b>
<b>Extraction, analyse par CCM .....</b>	<b>22.</b>
III.1. Extreaction des flavonoïdes .....	<b>23.</b>
III.2. Séparation et purification des flavonoïdes.....	<b>24.</b>
III.2.1. Méthode chromatographiques .....	25
III.2. Etude Phytochimique.....	22
III.2.1. Extraction des Flavonoïdes .....	22
III.2.2. Contrôle et analyse par la chromatographie sur couche mince.....	26
 CONCLUSION GENERALE .....	 32
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	34

## Liste des figures

Figure II-1 : squelette de base et numérotation adoptée des flavonoid .....	3
Figure II-2 : les principales classes des flavonoïdes .....	4
Figure I-3 : Biosynthèse des flavonoïcides .....	11
Figure I-4 : métabolisme des flavonoïdes. ....	12
Figure II-1 : les plantes des Lamiacées .....	16
Figure II-2 : Marrube blanc ( <i>Marrubium vulgare</i> L).....	17
Figure II-3 : Métabolites secondaires isolés à partir de <i>M. vulgare</i> (Djahra et al., 2012).....	18
Figure III-1 : Schéma de l'analyse CCM des flavonoïde .....	19
Figure III-2: Protocole d'extraction liquide liquide a l'ampoule a decanter .....	<b>20.</b>
Figure III-3 :l'extraction liquide-liquide avec l'éther de pétrole .....	23
Figure III-4 :l'extraction liquide-liquide avec le chloroforme .....	24
Figure III-5 :l'extraction liquide-liquide avec l'acetate d'ethyle .....	25
Figure III-6 :l'extraction liquide-liquide par le n-butanol.....	25
Figure III-7 :l' évaporation rotatif .....	26
Figure III-8 :Sys 1 ET2O/éthanol.....	28
Figure III-9 : Sys2 toluène/éthanol/méthyle/éthyle cétone .....	28
Figure III-10 : Sys 3 H2O/méthanol/acétyle acétone .....	28
Figure III-11 : Sys 4 H2O/BUTANOL/éthanol/ACIDE ACETIQUE .....	29
Figure III-12: Sys 1 ET2O/éthanol.....	29
FigureIII-13: Sys2 toluène/éthanol/méthyle/éthyle cétone .....	30
Figure III-14: Sys 3 H2O/méthanol/acétyle acétone .....	30
Figure III-15 : Sys 4 H2O/BUTANOL/éthanol/ACIDE ACETIQUE .....	30
Figure III-16 la bactérie e.coli .....	32.
Figure III-17 : microscope de e.colie .....	<b>34.</b>
Figure III-18 : microscope de bactérie pseudomonas aeruginosa .....	41
Figure III-19 : microscope de bactérie type staphylococcus aureus .....	<b>41.</b>
Figure III-20 : colonie de proteus mirabilis.....	43

## Liste des tableaux

Tableau I-1 : sources naturelles de flavonoïdes .....	6
TableauII-1 : classification scientifique de la plante Marrubium vulgare.....	17
Tableau III-1: la valeur de Rf de l'extrait d'acétate d'éthyle .....	<b>19.</b>
Tableau III-2 : la valeur de Rf de l'extrait n-butanol .....	<b>25</b>

# Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADV: adénovirus

APCI: l'ionisation chimique à pression atmosphérique

ARN: Acide ribonucléique

AS: anthocyanine synthase

ATP : Adenosine pyrophosphate

A/WS/33 : le virus de la grippe A

Co : Degré de sucrose

C.C: chromatographie sur colonne

C.C.M: chromatographie sur couche mince

C4H: cinnamate-4-hydroxylase

C6-C3-C6 : deux cycles en six atomes de carbone (C6) reliés par une chaîne en trois atomes de carbone(C3).

DFR: dihydro flavonol réductase

DMBA : 7,12 diméthylbenz (a)anthracène

ESI: l'électrospray ou l'ionisation par électro-ébulisaison

FAB: le Fast Atom Bombardment

F3H : Flavanone 3-hydroxylase

h: Heure

HPLC: chromatographie liquide à haute pression

HV: le virus de l'herpes

H<sub>2</sub>O: Eau

IE : l'ionisation par impact électronique

IFS: isoflavone synthase

GN : gélose nutritive

malonyl-CoA : malonyl-coenzyme A

# **INTRUDITION GENERALE**



## **Introduction générale :**

Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures. De génération en génération, ils ont transmis leur savoir et leurs expériences en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit. Ainsi, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne [1]. En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales [2].

En Afrique où les médicaments à base de plante sont toujours utilisés par de nombreuses populations pour des soins sanitaires, le pouvoir thérapeutique des plantes était connu de façon empirique [3]. La flore algérienne, avec ses différentes espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, reste très peu explorée tant sur le plan phytochimique que sur le plan pharmacologique [4]. L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables, qui pourrait justifier les multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradithérapie [5].

Ces dernières années, nous avons assisté à un grand regain des phytothérapeutes pour les produits riches en polyphénols, et principalement en flavonoïdes. Ces derniers ont d'ailleurs, montré qu'ils avaient des propriétés biologiques très importantes et très vastes. Nous pouvons dire que ce sont notamment de grands antioxydants et antibactériens.

Les travaux que nous avons effectués dans ce cadre sont reportés dans ce mémoire sous forme de trois chapitres et sont traités comme suit:

- Le premier chapitre est concerné aux généralités sur les flavonoïdes.
- Le deuxième chapitre sera concerné à la présentation de l'espèce *marrubium vulgare*.
- Le troisième chapitre concerne l'extraction, toutes les démarches et les méthodes nécessaires à la séparation des flavonoïdes et les méthodes d'analyses décrivant nos travaux personnels ,de tests chimiques et des protocoles expérimentaux.

Enfin, une conclusion qui résume l'ensemble de résultats obtenus suivis de discussions et d'une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus. Le but de ce travail est la détection structurale des métabolites secondaires de l'espèce *marrubium vulgare*. L'extraction de ces métabolites secondaires basée sur leur solubilité dans plusieurs solvants organiques de polarités différentes.

**CHAPITRE I**

**GENERALITES SUR LES**

**FLAVONOIDES**

## I.1.Introduction :

En 1952, HINREINER a inventé le terme "flavonoïde" pour désigner les pigments ayant une structure similaire à celle des flavones, dérivée du mot latin "flavus" signifiant jaune [6]. Les flavonoïdes représentent une vaste gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, présents dans diverses parties des plantes selon leur type et leur stade de développement [7]. Ils sont responsables de la coloration des fleurs et des fruits en jaune ou en blanc [8]. et présentent divers effets biologiques bénéfiques, tels que des propriétés anti-ulcéreuses, anti-inflammatoires, anti-hépatotoxiques, antioxydantes, antiallergiques, . cardiovasculaires [9] et antimicrobiennes. [10]

## I.2. Définition :

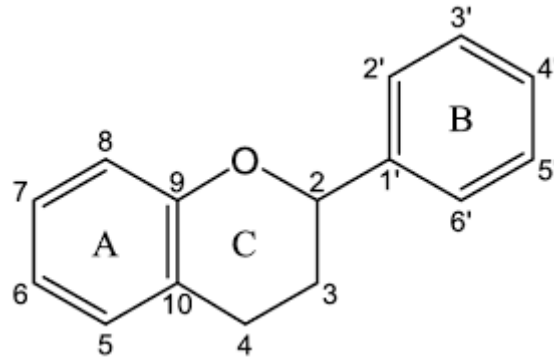
Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques que l'on trouve dans divers organismes, notamment les végétaux, les fruits et les légumes. Ils se trouvent dans différentes parties de ces organismes, telles que les feuilles, les tiges, les fleurs, les fruits et le pollen. Ces composés agissent comme des pigments colorés, offrant une large gamme de couleurs à ces organismes. Ils jouent un rôle crucial dans la protection contre l'oxydation et les dommages causés par les rayons solaires, tout en attirant les insectes pollinisateurs. De plus, les flavonoïdes contribuent à la saveur des fruits et des légumes [1].

Il existe environ 4 000 variétés de flavonoïdes, regroupées en quatre principaux groupes : la quercétine (présente dans des aliments comme l'oignon, le brocoli et la pomme), les flavonones (principalement trouvées dans le citron), les catéchines (présentes dans des aliments comme le thé et le vin rouge) et les anthocyanines (présentes dans des fruits rouges, le raisin et le vin rouge). Les flavonoïdes comprennent également d'autres composés tels que le bêta-carotène et les caroténoïdes [2].

L'importance des flavonoïdes a été mise en évidence, en particulier par le phénomène connu sous le nom de "paradoxe français", qui fait référence à la faible mortalité observée chez les habitants des régions méditerranéennes, malgré une consommation relativement élevée de graisses saturées. Ce phénomène a été attribué en partie à une consommation modérée de vin rouge, riche en flavonoïdes. Le terme "flavonoïdes" dérive du mot "flavedo", qui désigne la couche externe des écorces d'oranges [3].

### I.3. Structure chimique :

La structure chimique des flavonoïdes est caractérisée par 15 atomes de carbone organisés en trois cycles aromatiques (A, B et C) reliés entre eux, ainsi qu'un groupe phénol [4]. (figure 1).



**Figure I-1 : squelette de base et numérotation adoptée des 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 .[4] [5]

### I.4. Classification :

Les différentes classes de flavonoïdes se distinguent par leur cyclisation et le degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C, tandis que les composés individuels au sein d'une même classe varient en fonction de la substitution des cycles A et B. Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Fréquemment, un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont méthylés, acétylés, sulfatés ou prénylés. Dans les plantes, les flavonoïdes se trouvent généralement sous forme d'O- ou de C-glycosides. Les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides sont les plus courants, avec des substituants attachés aux groupes hydroxyles de la génine, généralement en position 3 ou 7. Pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, généralement en position C-6 ou C-8. Les sucres les plus courants incluent le rhamnose, le glucose, le galactose et l'arabinose, ainsi que des disaccharides comme le néohespéridose et le rutinose.

De plus, les sucres sont souvent substitués par des résidus d'acyles tels que l'acétate et le malonate [6] (figure 2).

Classe	Structure générale	Flavonoïde
Flavanol		(+)-catéchine (+)-épicatéchine épigallocatechine gallate
Flavone		chrysin apigénine rutine lutéoline lutéoline glucosides
Flavonol		kaempferol quercétine
Flavanone		myricétine tamarixétine naringine taxifoline hesperidine
Isoflavone		génistine génistéine
Anthocyanidine		apigénidine cyanidine

Figure I-2 : les principales classes des flavonoïdes

#### I. 4.1 Les flavones :

Ce sont une sous-classe de flavonoïdes présente dans de nombreux aliments végétaux, notamment les agrumes, le persil et le céleri. Leur structure chimique comprend trois anneaux aromatiques reliés, sans groupe hydroxyle en position 3 sur l'anneau C. Les flavones les plus courantes sont la lutéoline et l'apigénine, connues pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Elles sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour diverses applications thérapeutiques [7].

#### **I.4.2 Les flavonols :**

Ce sont une sous-classe de flavonoïdes présents dans divers aliments d'origine végétale comme la lutéoline, apigénine. Leur structure chimique comprend trois anneaux aromatiques reliés, avec un groupe phénol sur l'anneau C et un groupe céto en position 4. Les principales sources alimentaires de flavonols incluent les oignons, les brocolis, les pommes, les baies, le thé et le vin rouge. Ils sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses, offrant des avantages pour la santé, notamment la réduction du risque de maladies cardiovasculaires et de certains cancers. Après ingestion, les flavonols subissent un métabolisme dans l'organisme avant d'être excrétés. Ils sont également étudiés pour leur potentiel thérapeutique dans le traitement de diverses maladies [7].

#### **I.4.3 Les flavanols :**

Egalement connus sous le nom de catéchines, sont une sous-classe de flavonoïdes présente dans divers aliments végétaux tels que le thé, le cacao, les fruits et les légumineuses. Leur structure chimique comprend trois anneaux aromatiques reliés entre eux, avec un groupe hydroxyle en position 3 sur l'anneau C. Les flavanols, comme l'épicatéchine et l'EGCG, sont réputés pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, cardioprotectrices et neuroprotectrices. Ils sont associés à une réduction du risque de maladies cardiovasculaires, de certains cancers et de maladies neurodégénératives. Les flavanols sont utilisés depuis des siècles dans la médecine traditionnelle pour leurs effets bénéfiques sur la santé [7].

#### **I.4.4 Les flavanones :**

Ce sont une sous-classe de flavonoïdes présente principalement dans les agrumes tels que les oranges, les pamplemousses et les citrons. Leur structure chimique comprend trois anneaux aromatiques reliés, avec un groupe cétone en position 4 sur l'anneau C. Les flavanones les plus courantes sont la naringénine et l'hespéridine, qui ont démontré des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et cardiovasculaires bénéfiques pour la santé. Elles sont également utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs effets médicaux, notamment pour soutenir la santé du foie et dans la lutte contre le cancer [7].

#### **I.4.5 Les isoflavones :**

Ce sont une sous-classe de flavonoïdes principalement présente dans le soja et d'autres légumineuses. Leur structure chimique comporte un anneau de benzopyrane et un groupe phénol, leur conférant des propriétés uniques. Les principaux composés incluent la génistéine, la daidzéine et

la glyciteine. Les isoflavones ont des effets bénéfiques sur la santé, notamment des propriétés œstrogéniques, antioxydants, anti-inflammatoires et cardiovasculaires. Elles sont associées à une réduction de risque de maladies chroniques et sont parfois utilisées pour soulager les symptômes de la ménopause [8].

#### I.4.6 Les anthocyanidines :

Sont des flavonoïdes présents dans divers fruits et légumes colorés, tels que les baies, les raisins rouges et les cerises. Leur structure chimique inclut un noyau de flavylum, responsable de leurs couleurs vives. Les principales variétés d'anthocyanidines comprennent la cyanidine, la delphinidine et la malvidine. Elles offrent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancérigènes, associées à des bienfaits pour la santé tels que la réduction du risque de maladies cardiovasculaires. Les anthocyanidines sont utilisées comme colorants naturels dans l'industrie alimentaire et sont également prisées en médecine traditionnelle pour leurs vertus médicinales [8]. Le tableau 1 donne les sources naturelles des flavonoïdes.

**Tableau I-1 : sources naturelles de flavonoïdes**

<i>Flavonoid</i>	<i>Source : produits alimentaires et plantes médicinales</i>	<i>Flavonoïde</i>	<i>Source : produits alimentaires et plantes médicinales</i>
<b>Flavones</b>		Myricétine	<i>Thea sinensis, Vaccinium macrocarpon, Vitis vinifera</i>
Apigénine	<i>Apium graveolens, Passiflora incarnata, Petroselinum sativum</i>	<b>Flavonols glycosylés</b>	
<b>Flavones glycosylés</b>		Rutine (rutoside)	<i>Eucalyptus macrorrhyncha, Fagopyrum esculentum, Stellaria media, Sophora japonica</i>
Baicaline	<i>Scutellaria baicalensis</i>	<b>Flavan-3-ols</b>	
<b>Flavonols</b>		Catéchine	<i>Thea sinensis, Vitis vinifera</i>
Quercétine	<i>Allium cepa, Crataegus cuneata, Ginkgo biloba, Glycyrrhiza glabra, Morus alba, Olea europea, Solanum lycopersicum, Thea sinensis, Vaccinium macrocarpon, Vitis vinifera, Pueraria thumbergiana</i>	<b>Flavanones</b>	
<b>Flavonols glycosylés</b>		Naringénine	fruits du genre Citrus ( <i>sp. aurantium, limon, etc.</i> )
Kaempférol	<i>Cichorea endivia, Ginkgo biloba, Raphanus sativus, Thea sinensis, Vitis vinifera</i>	<b>Isoflavones</b>	
		Génistéine	<i>Soya hispida, Stellaria media, Pueraria lobata, Sophora japonica</i>

#### I.5. Distribution et localisation:

Les flavonoïdes, qui sont des composés hétérosidiques hydrosolubles, sont stockés dans les vacuoles des cellules végétales. Ils sont présents dans diverses parties des plantes, telles que les cellules épidermiques des fleurs, les parenchymes des tiges et des racines, ainsi que

dans l'épiderme des feuilles, ou répartis entre le mésophylle et l'épiderme. Les génines, en particulier les flavonoïdes simples et polyméthylés, se trouvent seules dans les exsudats farineux de certaines plantes, dans les cuticules des feuilles, des écorces et des bourgeons, ou sous forme de cristaux dans les cellules de certains cactus, tels que l'Asptrophytum. La similarité des profils de flavonoïdes entre les plantes taxonomiquement proches en fait des marqueurs chimiotaxonomiques utiles pour la classification des plantes. Les agrumes, les oignons, le vin rouge, les pommes, les fruits rouges, l'hamamélis, le gingko, le noisetier, les fines herbes, l'ortie, le poireau, et d'autres représentent les sources les plus riches en flavonoïdes parmi les fruits, légumes et plantes. On en trouve également dans des aliments comme le café, le thé, le vin, la bière et le chocolat (cacao). Consommer autant que possible des fruits et légumes crus semble être la meilleure façon de bénéficier pleinement des flavonoïdes [9] [10].

## **I.6. Facteurs affectant la coloration :**

### **I.6.1. Acidité (pH) :**

Le pH varie dans les vacuoles de 2,5 à 7,5. Par exemple, la cyanidine (un type d'anthocyane) exhibe une coloration rouge en milieu acide, violette en milieu neutre et bleue en milieu basique.

### **I.6.2 .Degré d'hydroxylation du cycle B :**

L'effet de "blanchissement" augmente à mesure de l'oxydation.

## **I.7 .Activités biologiques des flavonoïdes :**

### **I.7.1.Propriétés antioxydantes et piègeurs de radicaux libres :**

La caractéristique la mieux établie des flavonoïdes est leur activité antioxydante, qui leur permet de neutraliser les radicaux libres, notamment les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\cdot$ ), les anions superoxydes ( $\text{O}^{2-}$ ) et les radicaux peroxylipidiques.

Les radicaux libres sont produits dans diverses situations, telles que l'anoxie, où l'anion superoxyde ( $\text{O}^{2-}$ ) est généré, l'inflammation, qui conduit à la production d'anions superoxydes ( $\text{O}^{2-}$ ) par la NADPH-oxydase membranaire des leucocytes activés, ainsi que la formation du radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ) très réactif par dismutation. L'auto-oxydation des lipides survient lors du stress oxydatif, où les radicaux libres attaquent des composés bioactifs



tels que les protéines, les acides nucléiques et les lipides, contribuant ainsi à diverses pathologies, notamment le cancer et l'athérosclérose.

Les flavonoïdes neutralisent et stabilisent les radicaux libres grâce à leurs groupes hydroxyles (C3-OH) hautement réactifs. De plus, ils peuvent chélater les ions métalliques, qui peuvent amplifier les effets nocifs en générant des radicaux hydroxyles (OH·) à partir de leurs protéines de liaison ou de transport.

En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la carcinogenèse, l'angiogenèse, la prolifération cellulaire, et d'affecter le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales [11-15].

### **I.7.2 .Propriétés inhibitrices d'enzymes :**

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase, de la phospholipase A2 et des enzymes de l'inflammation : la cyclooxygénase et la lipo-oxygénase [16].

### **I.7.3 .Effets protecteurs vasculaires :**

Les flavonoïdes exercent une action sur les vaisseaux sanguins sous forme d'une activité vitaminique appelée « vitamine P ». Cette activité contribue au maintien d'une perméabilité vasculaire normale. En conséquence, ils sont utilisés dans le traitement de certaines conditions pathologiques caractérisées par une altération de la perméabilité vasculaire. Par exemple, l'O-β-hydroxyéthyl rutoside (HR) a été étudié chez des patients souffrant d'insuffisance veineuse chronique, montrant qu'un traitement à base de HR pouvait restaurer les paramètres hémorhéologiques altérés. D'autres flavonoïdes sont responsables d'une augmentation de la résistance des capillaires, et cette activité semble être liée aux effets de certains flavonoïdes sur les plaquettes, les leucocytes et les enzymes impliquées dans la coagulation sanguine [17] [18].

### **I.7.4 .Propriétés antihépatotoxiques :**

Les flavonoïdes dérivés de *Silybum marianum*, également connu sous le nom de chardon-Marie, ont été utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle pour traiter les affections hépatiques. Les principes actifs de l'extrait comprennent un mélange complexe de composés flavolignanes et flavanones appelé silymarine. Des études menées sur des modèles expérimentaux animaux ont démontré que la silymarine exerce un effet bénéfique sur les hépatocytes intacts ainsi que sur les cellules hépatiques endommagées de manière irréversible.

Elle agit en modulant la membrane cellulaire pour prévenir l'entrée de substances toxiques et en stimulant la capacité régénérative des cellules hépatiques après une hépatectomie partielle. L'activité hépatoprotectrice de la silybine, le principal flavolignane présent dans la silymarine, a été évaluée chez des souris intoxiquées par des doses non thérapeutiques d'acétaminophène, démontrant son efficacité. Cependant, le mécanisme exact de cette protection reste à clarifier. Par ailleurs, la quercétine, extraite d'*Artemisia scoparia*, a été identifiée comme possédant une activité protectrice contre l'hépatotoxicité du paracétamol chez le rat et la souris.[19] [20]

### **I.7.5.Propriétés antiallergiques :**

Les flavonoïdes possèdent des propriétés antiallergiques en agissant par inhibition des enzymes responsables de la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles, notamment l'AMPC phosphodiesterase et la  $Ca^{++}$  ATPase. De plus, la quercétine présente un effet inhibiteur puissant sur la libération d'histamine à partir des mastocytes [21].

### **I.7.6.Activité anti-inflammatoire :**

En laboratoire, plusieurs flavonoïdes sont capables de moduler le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire. Par exemple, la myricétine et la quercétine inhibent l'action des cyclo-oxygénases et des lipoxygénases à des concentrations relativement élevées. À des concentrations plus faibles, l'inhibition préférentielle concerne la lipoxygénase. Des recherches suggèrent que ces flavonoïdes pourraient présenter une activité anti-inflammatoire efficace sans les effets indésirables ulcérogènes. L'hespéridine, bien qu'inactive par voie orale, présente une activité anti-inflammatoire significative lorsqu'elle est administrée par voie sous-cutanée chez le rat, induisant une réduction de l'œdème provoqué à la fois par la carragénine et le dextran [24].

### **I.7.7.Activité anti-ulcérogène :**

Les flavonoïdes possèdent la capacité de protéger la muqueuse gastrique contre différents agents ulcérogènes. Par exemple, l'hypolaétine-8-glucose, un flavonoïde présent dans plusieurs espèces du genre *Sideritis*, démontre une activité anti-ulcérogène significative. La naringine et la quercétine présentent également une activité anti-ulcérogène, comme démontré chez le rat où l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol. On suppose que la quercétine exerce ses effets cytoprotecteurs en stimulant la production de prostaglandines, en inhibant la production de leucotriènes, en favorisant la production de mucus et grâce à ses propriétés antioxydantes.

Par ailleurs, la quercétine a été identifiée comme inhibant la croissance de *Helicobacter pylori* et la production d'acide par les cellules pariétales en réponse à une stimulation par l'histamine et l'AMPc dibutyrique [23] [22].

### **I.7.8. Autres effets biologiques :**

D'autres effets biologiques des flavonoïdes sont observés. Ils ont un rôle préventif contre la cataracte diabétique en inhibant l'aldose réductase du cristallin. Par exemple, la myricétine démontre des effets hypoglycémiant et hypotriglycéridémiant chez les animaux diabétiques. Leur impact sur le système immunitaire est complexe et reste encore peu élucidé. Certains flavonoïdes réduisent l'activation du complément, ce qui diminue généralement la réponse inflammatoire. À des doses élevées, ils inhibent les fonctions lymphocytaires, mais à des concentrations plus faibles, ils pourraient agir comme immunostimulants chez les sujets immunodéprimés.

L'activité immuno-modulatrice des flavonoïdes dépend de leur capacité à inhiber la formation des eicosanoïdes et de l'histamine, ainsi que de leur capacité à piéger les radicaux libres. Ils ont également des propriétés antibactériennes et antivirales contre différentes souches bactériennes. En outre, les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire de divers virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus [25].

### **I.8 La biosynthèse des flavonoïdes :**

La biosynthèse des flavonoïdes implique plusieurs étapes clés. Initialement, les classes de flavonoïdes se forment à partir de précurseurs biogénétiquement et structurellement apparentés. Le cycle A dérive de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), tandis que les cycles B et C proviennent du métabolisme du glucose par la voie du shikimate.

Après la désamination de la phénylalanine par la phényl ammonia lyase (PAL), qui conduit à la formation du cinnamate, celui-ci est transformé en acide coumarique puis en 4-coumaroyl-coenzyme A, respectivement sous l'action de l'enzyme cinnamate-4-hydroxylase (C4H) et la CoA-ligase (4CL).

L'étape cruciale de la biosynthèse des flavonoïdes est la condensation de trois molécules de malonyl-coenzyme A avec le 4-coumaroyl-coenzyme A, catalysée par la chalcone synthase, aboutissant à la formation de la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone. Sous l'action de la chalcone

isomérase, la fermeture stéréospécifique du cycle C conduit à la scule (2-5)-flavanone: la naringénine. Cette chalcone peut également cycliser en aurone, étant le précurseur commun de toutes les classes de flavonoïdes.

Des étapes ultérieures, telles que les réarrangements, les oxydations, les alkylations, les glycosylations et les acylations, transforment les flavonoïdes en leur forme finale in vivo.

Le cas particulier des flavonoïdes C-méthylés pourrait s'expliquer par la présence d'une méthylchalcone synthase catalysant la réaction de condensation entre le méthylmalonyl-CoA et le 4-coumaroyl-CoA, produisant ainsi la chalcone méthylée correspondante, qui, par la suite des réactions, conduirait aux autres flavonoïdes C-méthylés.

La figure ci-dessous illustre un schéma de biosynthèse des flavonoïdes, impliquant diverses enzymes telles que la chalcone synthase (CHS), la chalcone isomérase (CHI), la flavanone 3-hydroxylase (F3H), l'isoflavone synthase (IFS), la dihydroflavonol réductase (DFR) et l'anthocyanine synthase (AS), ainsi que des réactions de glycosylation représentées par R--H, -OH ou -OCH3 et des groupes de sucre (OG--O-sucre) .[26-31].

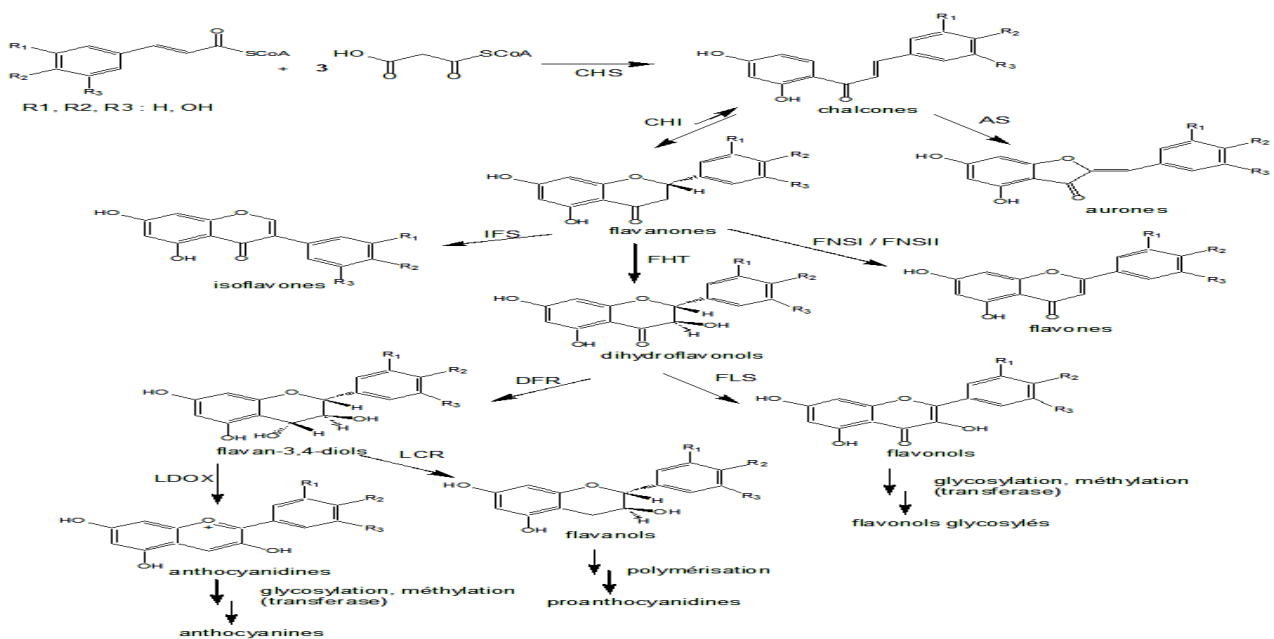


Figure I-3 : Biosynthèse des flavonoïdes

## 1.9. La biodisponibilité des flavonoïdes :

La biodisponibilité des flavonoïdes est un facteur crucial pour leurs effets sur la santé, désignant la proportion d'un nutriment présent dans un aliment qui est effectivement assimilée par l'organisme. Selon Wiseman (1999), la biodisponibilité absolue correspond à la proportion

des molécules qui entrent dans la circulation sanguine sous leur forme intacte après leur consommation, en traversant la paroi intestinale et le foie.

### a/ Absorption :

À l'exception de la catéchine, les flavonoïdes sont présents dans les plantes sous forme glycosylée, liés aux sucres par des liaisons  $\beta$ -osidiques. Seuls les aglycones peuvent être absorbés par l'intestin grêle, tandis que les glycosides sont hydrolysés en aglycones par la microflore colique, qui dispose d'enzymes capables de cliver les liaisons  $\beta$ -osidiques. Les catéchines polymériques, appelées proanthocyanidines, présentes en quantités considérables dans l'alimentation, montrent que les formes dimères et trimères peuvent être absorbées, tandis que les polymères de degré de polymérisation élevé nécessitent une dégradation avant d'être absorbés par la paroi intestinale [32].

### b/ Métabolisme :

Deux compartiments sont importants pour le métabolisme des composés phénoliques : les tissus (foie et reins), où des enzymes de biotransformation agissent sur les flavonoïdes aglycones et les métabolites coliques absorbés, principalement localisés dans le foie, les reins et l'intestin grêle ; et le côlon, où la microflore colique dégrade les flavonoïdes aglycones libérés (après hydrolyse des glycosides) en produisant des métabolites tels que des acides phénylacétiques, des acides phénylpropioniques, des valérolactones et des dérivés des acides benzoïques. Les groupements hydroxyles des métabolites subissent une conjugaison par acide glucuronique ou sulfate [33](figure 4).

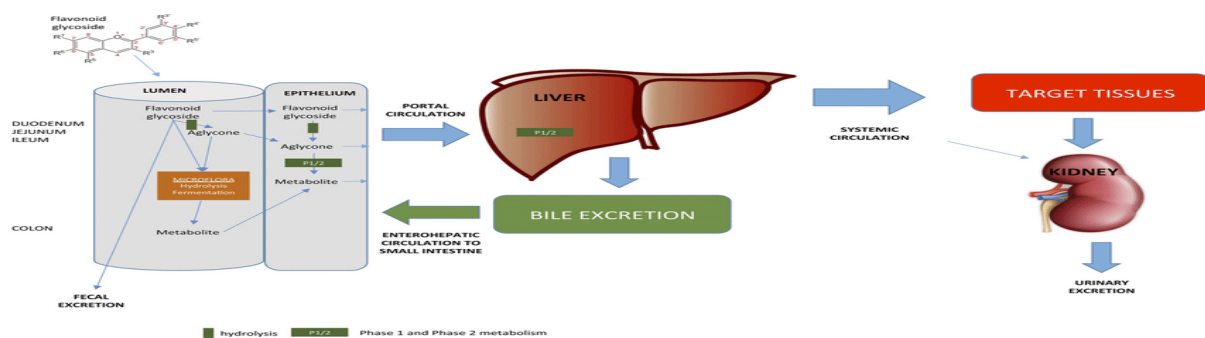


Figure I-4 : métabolisme des flavonoïdes.

## I.10. Intérêts des flavonoïdes:

### I.10.1. Fonctions au niveau du producteur:

Les flavonoïdes occupent un rôle significatif dans le règne végétal, notamment en :

- Contribuant à la pigmentation des tissus végétaux, des fleurs, des fruits et parfois des feuilles.
- Exerçant un attrait sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs grâce à la coloration des fleurs, ce qui facilite une étape cruciale de la reproduction des plantes.
- Agissant comme des composés de défense en repoussant certains insectes et prédateurs grâce à leur goût désagréable.
- Assurant une protection contre les rayonnements UV.
- Participant à la production de nodules racinaires, agissant ainsi comme un système de fixation de l'azote après l'infection par le Rhizobium chez les Fabacées.

### **I.10.2. Actions pharmacologiques:**

Les flavonoïdes suscitent un intérêt considérable en raison de leur importance thérapeutique. Ils peuvent jouer un rôle crucial dans la prévention de diverses maladies liées au stress oxydatif, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives. En général, en raison de la facilité de prélèvement de l'atome d'hydrogène phénolique, les composés phénoliques ont la capacité de rivaliser efficacement avec les substrats oxydables pour les radicaux libres, formant ainsi des radicaux flavonoïdes stables qui interrompent les processus de dégradation cellulaire initiés par l'attaque radicalaire.

Les isoflavones présentent une structure similaire aux œstrogènes, bien qu'ils ne soient pas de nature stéroïdienne. Ils possèdent des groupes hydroxyle en positions 7 et 4' de manière analogue à la molécule d'œstradiol, ce qui leur confère des propriétés pseudohormonales. En se liant aux récepteurs d'œstrogène, ils sont classés comme phyto-œstrogènes.

De manière générale, les flavonoïdes agissent comme des inhibiteurs enzymatiques *in vitro*. Ils inhibent l'hyaluronidase, notamment les flavones et les proanthocyanidols, ce qui maintient l'intégrité de la substance fondamentale de la gaine vasculaire. Ils inhibent également la catechol-O-méthyltransferase, augmentant ainsi la disponibilité des catécholamines et provoquant une élévation de la résistance vasculaire. L'inhibition de l'aldose réductase, impliquée dans la pathogenèse du diabète, est observée avec le quercitroside et les méthoxyflavones. De plus, les flavonoïdes inhibent la protéine kinase, en particulier le lutéolol, ainsi que la 5-lipoxygénase, réduisant la production de leucotriènes médiateurs de l'inflammation et des manifestations allergiques.

Moins fréquemment, les flavonoïdes peuvent stimuler une activité enzymatique, comme c'est le cas de la proline-hydroxylase. Cette stimulation favorise la formation de ponts entre les fibres de collagène, renforçant ainsi leur solidité et leur stabilité, et s'opposant à leur dénaturation. [34-37].

# **CHAPITRE II**

## **ETUDE BIBLIOGRAPHI SUR LA PLANTE**



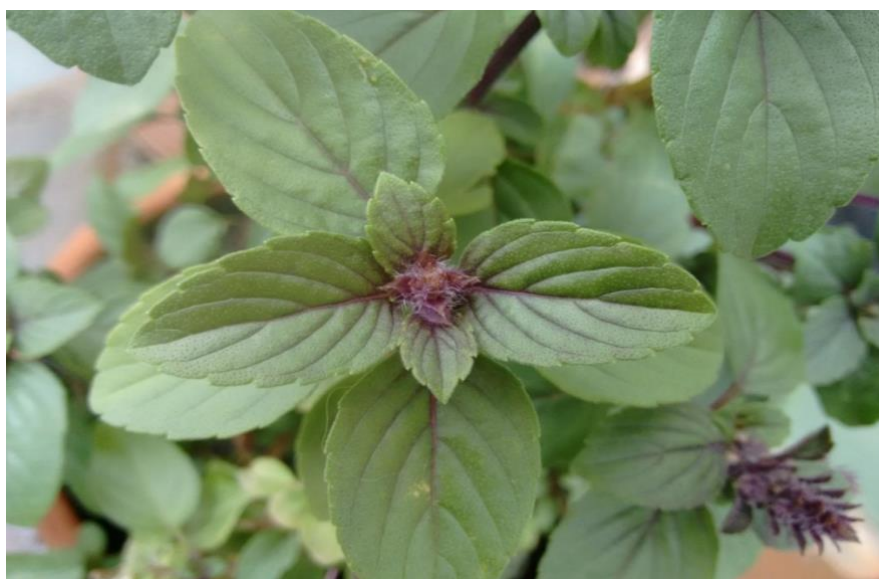
## II.1. Introduction

Le chapitre est consacré à la présentation de l'espèce *Marrubium vulgare*, l'étude phytochimique qui concerne l'extraction des flavonoïdes par les différents solvants organiques, contrôle et analyse par la chromatographie sur couche mince de l'extrait d'acétate d'éthyle et n-butanol avec la discussion et l'analyse des résultats que nous avons obtenus [38].

## II.2. Généralités sur la plante

### II.2.1. Famille des Lamiacées

La famille des Lamiaceae, dénommée aussi Labiées, regroupe des plantes herbacées et sous-arbustes répartis dans le monde entier [39]. Cette famille compte 6500 espèces, et quelques 200 genres très diversifiés qui caractérisent les climats de type méditerranéen. C'est une famille très homogène: une Lamiaceae est facile à reconnaître (Dupont, 2012). Selon Judd et al. (2002), Cette famille comporte des nombreuses plantes exploitées pour les essences ou cultivées pour l'ornementation et la plupart de ces espèces sont aussi bien utilisées dans la phytothérapie que dans la médecine moderne (Judd et al., 2002). Un très grand nombre des genres de la famille des Lamiaceae sont des sources riches en terpénoïdes et flavonoïdes. Le genre *Marrubium* (*Marrube*) qui est l'objectif de notre recherche comprend près de 30 espèces qui peuvent se trouver dans de nombreux pays du globe (Naghibi et al., 2005) [40] (figure 5).



**Figure II-1 : la plante *Marrubium Vulgare***

## II.2.3 sous espèce de *Marrubium vulgare*

### II.2.3.1 position systématique

D'après l'APG III la classification complète de *Marrubium vulgare* est donnée comme suit (Chase et al., 2009) : [41] (tableau 2).

**Tableau II-1: classification scientifique de la plante *Marrubium vulgare***

<b>Règne :</b>	Plantae
<b>Embranchement :</b>	Spermatophytes
<b>Classe :</b>	Magnoliopsida
<b>Sous-classe :</b>	Asteridae
<b>Ordre :</b>	Lamiales
<b>Famille :</b>	Lamiacées
<b>Genre :</b>	<i>Marrubium</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Marrubium vulgare</i>

### II.2.3.2 Description botanique

Le marrube blanc ou Marrube Commun (*Marrubium vulgare*) est une plante herbacée vivace pouvant atteindre 80 cm de hauteur, à tige quadrangulaire cotonneuse. Les feuilles pétiolées, ovales ou arrondies, à limbe crénelé sur les bords, sont blanchâtres et duveteux sur la face inférieure. Les fleurs petites, blanches, avec un calice à dents crochues, sont groupées en verticilles globuleux à l'aisselle des feuilles, elles apparaissent du mois de Mai jusqu'au mois de Septembre et parfois encore en hiver (Jean Bruneton, 2016) [42] (figure 6).



**Figure II-2 : Marrube blanc (*Marrubium vulgare*)**

### II.2.3.3 distribution géographique

Le marrube est répandu sur tout le continent américain, l'Asie, l'Europe et l'Afrique du Nord (Elbali Wahiban, 2021). Il est particulièrement abondant dans la région méditerranéenne (Delongueville and Scaillet, 2017). Le marrube blanc est généralement dispersé sur des sols calcaires dans des lieux incultes, terrains vagues, garrigues, prairies chaudes et sèches (Elbali Wahiba, 2021) [43].

### II.2.3.4 Constituants

Marrubium vulgare a fait l'objet de quelques études phytochimiques et pharmacologiques. En (2012), Djahra et son équipe ont isolé à partir de la partie aérienne du Marrubium vulgare 20 plusieurs métabolites tels que: les flavonoïdes, alcaloïdes, stachydrine, bétonicine, les stérols, les phényléthanoïdes glucosidiques (acteoside et forsythoside B), les dérivés de phénylpropanoïdes (acide caféique), les sesquiterpènes, les diterpènes (marrubénol et marrubiine), les triterpènes, les tanins, les saponosides et mucilages, les minéraux (potassium et surtout beaucoup de fer), les composés azotés (choline et stachydrine) (Djahra et al., 2012) [44] (figure 7).

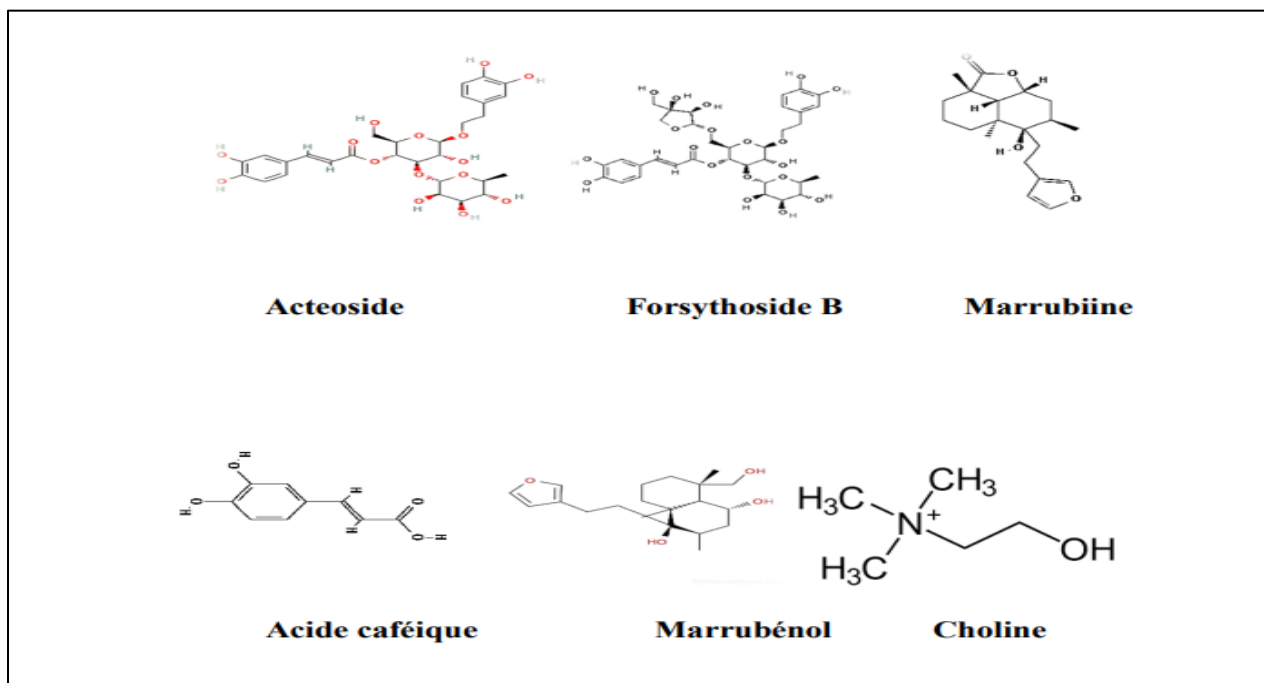


Figure II-3 : Métabolites secondaires isolés à partir de Marrubium vulgare (Djahra et al., 2012).

## II.2.4. Usage thérapeutique

### II.2.4.1. Antioxydant

Le déséquilibre des processus homéostatiques entre les oxydants et les anti-oxydants dans l'organisme, qui est causé par les radicaux libres, conduit au stress oxydatif. Le stress oxydatif est considéré comme la principale cause du vieillissement et d'une grande variété des maladies humaines, telles que les cancers, le diabète, les troubles neurodégénératifs, l'athérosclérose, l'ischémie cérébrale, etc..[45]. Les antioxydants sont des substances qui retardent, empêchent ou inhibent de manière significative les dommages oxydatifs causés aux molécules cibles (Lee et al., 2020) Les propriétés antioxydantes in vitro des extraits méthanoliques de *Marrubium vulgare* ont été déterminées en utilisant le test de piégeage des radicaux libres DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et les résultats ont révélé une forte activité avec la valeur de la concentration inhibitrice demi-maximale (IC50) de 8,24-12,42 µg/Ml (Keyvan et al., 2016) [46]. Le test de photochimiluminescence (PLC), évaluant l'activité antioxydante du composé en présence du radical anion superoxyde, espèces réactives de l'oxygène (ROS), également générées dans le corps humain, a déterminé le fort effet antioxydant des extraits de méthanol et d'acétone de *Marrubium vulgare* (261,41 et 272,90 µmol TE/g respectivement) a été réalisée par M. Rezgui et al (Rezgui et al., 2020) [47].

### II.2.4.2 antidiabétique

*Marrubium vulgare* a une réputation ethnomédicale d'agent antidiabétique (Hamzaa et al., 2019). Certains efforts ont été faits pour obtenir des preuves scientifiques soutenant son utilisation traditionnelle dans le contrôle du diabète sucré [48]. Hellal et al en (2020), ont effectué une recherche in vitro de l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase de six plantes médicinales traditionnelles algériennes, dont les extraits éthanoliques à 80 % de *M. vulgare* ont exercé un effet modéré (IC50 = 12,66 µg/mL) (Hellal et al., 2020). L'administration orale de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* a induit des effets antidiabétiques et antihyperlipidémiques significatifs, une dose de 100 mg/kg a réduit la glycémie de (50 %), tandis que les doses de 200 et 300 mg/kg ont montré une réduction de plus de (60 %) du même paramètre [49]. Une diminution des lipides totaux, des triglycérides et de cholestérol a été observée chez les animaux traités avec *Marrubium vulgare* par rapport au groupe témoin diabétique. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les flavonoïdes et les dérivés de verbascoside présents dans l'extrait d'examen étaient à l'origine des effets observés

(Boudjelal et al., 2012). Rhallab et al ont montré que l'administration orale des extraits méthaniques de *Marrubium vulgare* a entraîné une baisse significative du taux de glucose dans le sang, de l'urée, de l'acide urique et de la créatinine dans le sérum, ainsi une amélioration des profils lipidiques par rapport au rats diabétiques [50].

#### *II.2.4.3 antibactérienne*

Des différents extraits du potentiel antibactérien de *Marrubium vulgare* (acétate d'éthyle, éther diéthylique, et 1-butanol) a été testé sur quatre souches des bactéries: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, et *Pseudomonas aeruginosa*. L'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* a montré une activité antibactérienne importante contre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* et *Candida albicans* [14]. De plus, une étude à déterminer l'activité antifongique des flavonoïdes (flavans et flavanols) extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* contre deux souches fongiques : *Aspergillus niger* et *Candida albicans*, en utilisant la méthode de diffusion sur milieu solide. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues se situent entre (6,25 et 100 µg/mL) ont entraîné une forte inhibition antifongique, qui dépasse souvent l'effet des antifongiques commercialisés (amphotéricine, fluconazole, terbinafine et nitrate d'éconazole), qui a marqué que les flavonoïdes de *Marrubium vulgare* ont un potentiel antifongiques puissants [51]. L'huile essentielle de *Marrubium vulgare* a un effet significatif sur les micro-organismes, en particulier les bactéries Gram<sup>+</sup> avec des zones d'inhibition et des valeurs CMI comprises entre (6,6 et 25,2 mm) et (1120 à 2600 µg/mL) respectivement, tandis que les bactéries Gram<sup>-</sup> présentent une résistance plus élevée. Quand l'activité antifongique, parmi les quatre souches testées, *Botrytis cinerea* a montré la plus forte réponse à l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*, avec des zones d'inhibition de (12,6 mm). Cependant, *Fusarium solani*, *Penicillium digitatum*, et *Aspergillus niger* ont été moins sensibles à cette huile essentielle [52].

# **CHAPITRE III**

## **EXTRACTION ET ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE**

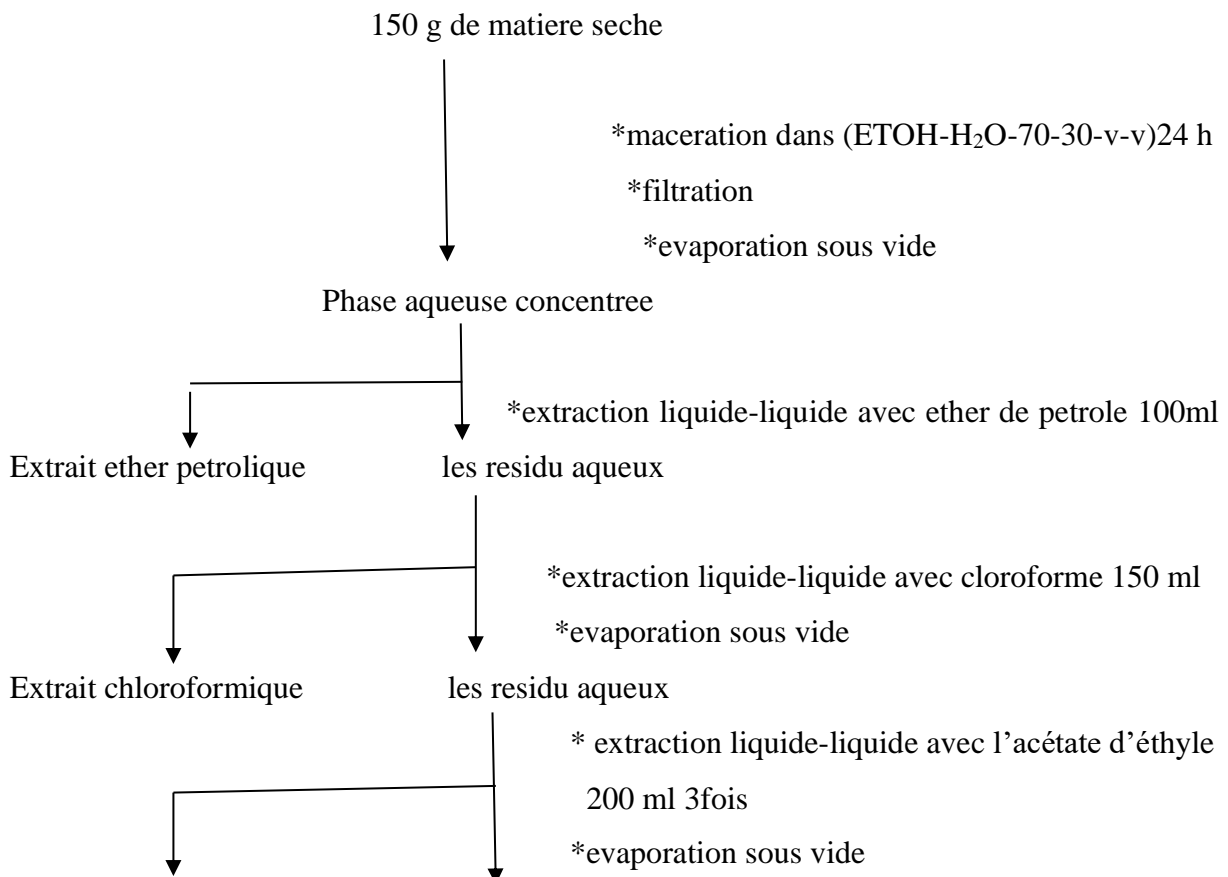
## III.1. Etude Phytochimique

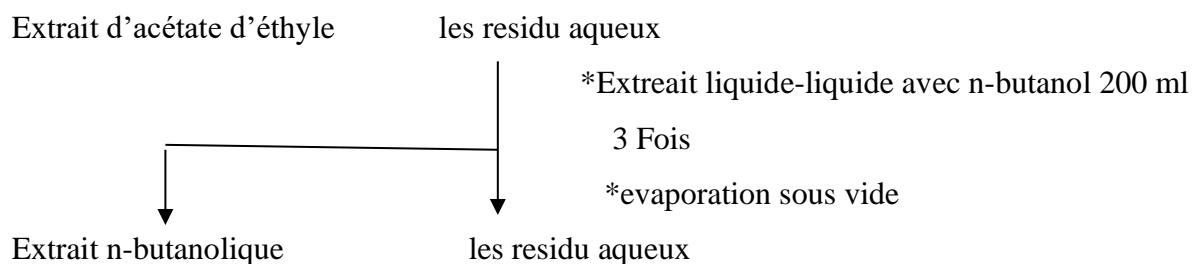
### III.1.1. Extraction des Flavonoïdes

#### III.1.1.1. extraction solide liquide

##### Principe

La macération est un processus où un solide est laissé dans un liquide froid afin d'en extraire les composés solubles, ou pour que le solide absorbe le liquide afin d'en obtenir le parfum ou la saveur, ou encore pour le conserver ou faciliter sa décomposition. Ce processus peut être réalisé dans divers liquides tels que l'alcool, l'eau, la saumure ou l'huile. Par exemple, dans ce cas spécifique, 150 g de matière végétale broyée sont soumis à une extraction par macération dans un mélange d'éthanol et d'eau (70/30 v/v) pendant 24 heures à température ambiante. Ensuite, les macéras sont filtrés et les filtrats sont évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 45°C. Le résidu obtenu subit une deuxième macération pendant 24 heures avec la quantité d'éthanol récupérée. L'extrait obtenu après filtration est concentré à sec sous pression réduite pour éliminer l'éthanol.





**Figure III-1 :schéma générale de protocole de l'extraction**

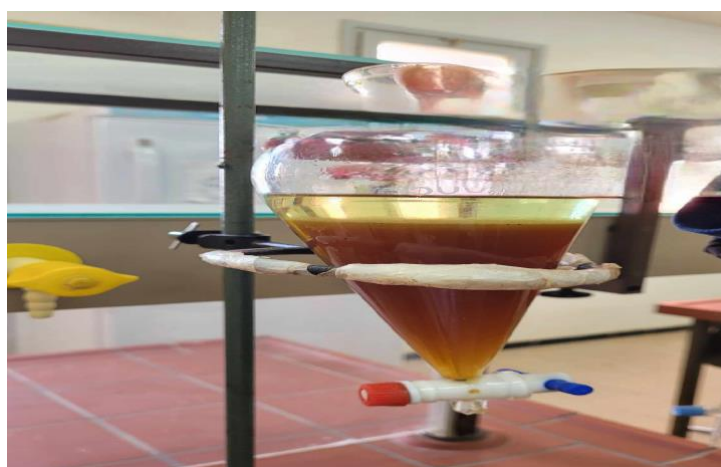
### *III.1.1.2Extraction liquide-liquide*

#### Principe

Basée sur la différence d'affinité d'un soluté entre deux phases non-miscibles, l'extraction liquide-liquide permet de transférer un soluté d'une phase liquide à une autre. En utilisant une ampoule à décanter, les deux phases peuvent être séparées en fonction de leur solubilité dans chaque solvant respectif. Les liquides se séparent en couches selon leur densité, avec la phase la moins dense au sommet.

#### III.2.1.2.1.Extraction par l'éther de pétrole

L'éther de pétrole, également connu sous le nom d'essence, est un solvant organique apolaire et aprotique qui permet d'éliminer la chlorophylle et les lipides. Après avoir introduit 100 ml d'éther de pétrole dans l'ampoule de décantation contenant la phase aqueuse, et après agitation et décantation des deux phases, on récupère dans un ballon la phase organique supérieure (d'éther de pétrole), qui est de couleur jaune mais contient des impuretés telles que les matières grasses, la chlorophylle, et autres.



**FigureIII-2 : l'extraction liquide-liquide avec l'éther de pétrole**



### III.1.1.2.2.Extraction par le chloroforme :

Le chloroforme est un composé organique de formule  $\text{CHCl}_3$ . C'est un solvant de polarité moyenne, un liquide incolore, dense et au goût sucré. Pour éliminer les graisses et les cires, la phase aqueuse est extraite avec du chloroforme. Après agitation et décantation des deux phases, on récupère dans un ballon la phase organique inférieure (de chloroforme), qui est de couleur vert foncé.



**Figure III-3: l'extraction liquide-liquide avec le chloroforme**

### III.1.1.2.3 Extraction par acétate d'éthyle

L'acétate d'éthyle est un liquide ayant pour formule  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ , doté d'une odeur fruitée caractéristique. C'est un ester issu de la réaction entre l'éthanol et l'acide acétique, principalement utilisé comme solvant. On introduit 200 ml d'acétate d'éthyle dans la phase aqueuse, traitée auparavant avec du chloroforme et contenue dans l'ampoule de décantation. Après agitation et décantation des deux phases, on récupère dans un ballon la phase organique supérieure (d'acétate d'éthyle) de couleur jaune. Cette opération est répétée trois fois pour obtenir les flavonoïdes.



**Figure III-4 :l'extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle**

#### III.1.1.2.4 Extraction par n-butanol :

200 ml de n-butanol sont ajoutés à la phase aqueuse, qui a été traitée précédemment avec de l'acétate d'éthyle et est contenue dans l'ampoule de décantation. Après agitation et décantation des deux phases, on récupère dans un ballon la phase organique supérieure (de n-butanol) avec une couleur marron clair. Cette opération est répétée deux fois pour obtenir les flavonoïdes très polaires.



**Figure III-5 : l'extraction liquide-liquide par le n-butanol**

### *III.1.1.3.L' évaporation des extraits :*

Passons ensuite à l'évaporation des extraits (chloroforme, acétate d'éthyle et butanol) pour éliminer les solvants organiques. L'évaporation des extraits précédents a été faite à l'aide d'un évaporateur rotatif.

L'évaporateur rotatif :

Un appareil utilisé en chimie pour distiller rapidement des solvants, dans le but de concentrer partiellement une solution ou pour évaporer complètement (éliminer tout le solvant) une solution ou une suspension. Le principe de cet appareil repose sur la distillation sous vide. La solution est mise en rotation pour éviter la formation de bulles de vapeur trop importantes ou moussantes, puis la pression est réduite à l'aide d'une trompe à vide pour accélérer l'évaporation. Ensuite, la solution est chauffée en fonction du solvant pour favoriser son évaporation.



**Figure III-6 : l' évaporateur rotatif**

### **III.1.2. Contrôle et analyse par la chromatographie sur couche mince**

Les deux extraits obtenus, à savoir l'acétate d'éthyle et le n-butanol, ont été soumis à une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM). Ces analyses ont été réalisées en utilisant des plaques de gel de silice d'une épaisseur de 0,25 mm, supportées par un support semi-rigide en aluminium.

### III.1.2.1. Description d'une analyse par CCM :

Préparation de la cuve de chromatographie :

- Introduire le mélange de solvants dans la cuve.
- Ajuster le niveau à environ 0,5 cm du fond de la cuve.
- Fermer hermétiquement la cuve

Dépôt de l'échantillon sur la plaque :

- Déposer l'échantillon en un point situé à 1 cm de l'extrémité inférieure de la plaque.
- La taille de la tache formée doit être d'environ 2 mm pour permettre une bonne séparation des produits, avec un diamètre d'environ 3 mm pour les composés multiples.
- Sécher délicatement à l'aide d'un séchoir.

Développement du chromatogramme :

- Placer la plaque dans la cuve en position verticale.
- Refermer hermétiquement le récipient.
- Lorsque le front du solvant atteint environ 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, retirer la plaque de la cuve et marquer cette position.

Observation :

- Les plaques sont ensuite observées sous une lampe UV-Visible à une longueur d'onde de 250 et 360 nm.
- Les couleurs des taches sont enregistrées, ainsi que les valeurs du Rf. Analyse d'extrait

### III.1.2.2. Analyse d'extrait d'acétate d'éthyle

Les systèmes d'éluion utilisés pour l'extrait d'acétate d'éthyle et de n-butanol sont représenté dans les tableau suivants :

**Tableau III-1 : systèmes d'éluion**

Eluant	volume
Et <sub>2</sub> O / éthanol	(1,9)
Toluène/éthanol/méthyle éthyle cétone	(3, 3,4)
H <sub>2</sub> O/méthanol/Acétyle acétone	(7, 3,1)
H <sub>2</sub> O/Butanol/éthanol/Acide Acétique	(3 et 1.5 et 2et 1)

- **Chromatogramme 1 :**

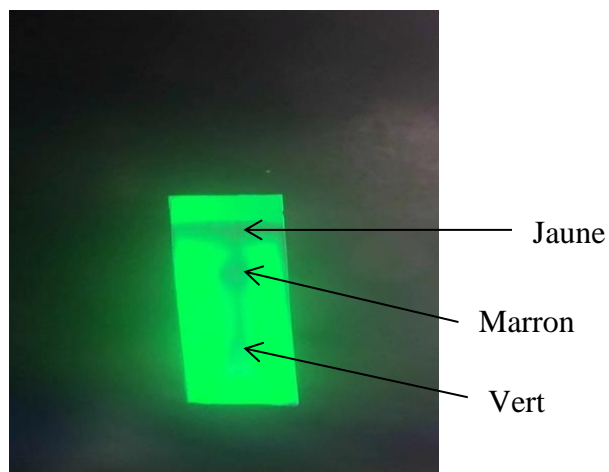
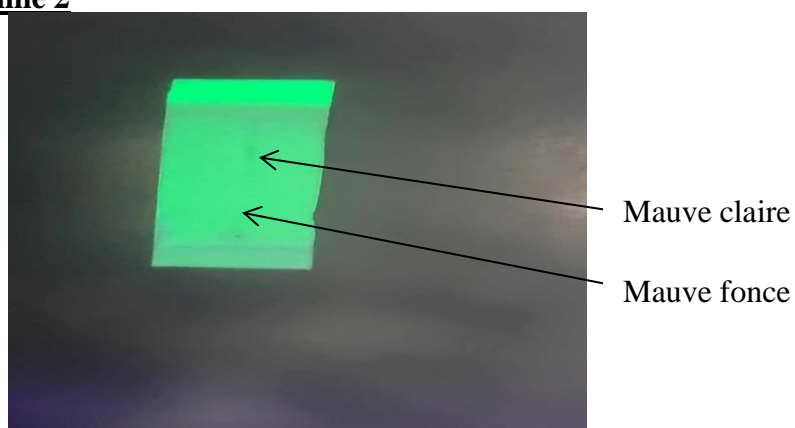


Figure III-7 :Sys 1 Et<sub>2</sub>O/éthanol

- **Chromatogramme 2**



FigureIII-8: Sys2 : toluène/éthanol/méthyleéthyle cétone

- **Chromatogramme 3**

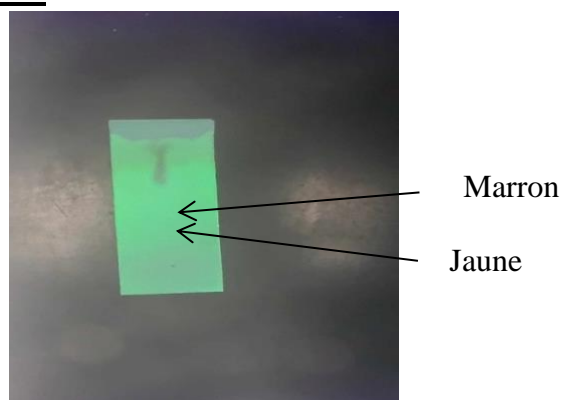
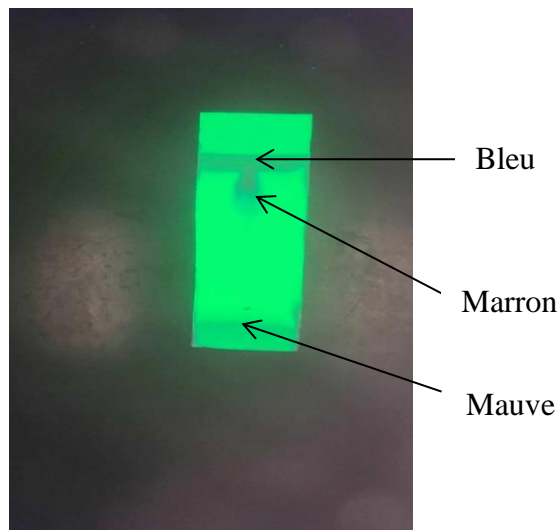


Figure III-9 : Sys 3 : H<sub>2</sub>O/méthanol/acétyle acétone

- **Chromatogramme 4**

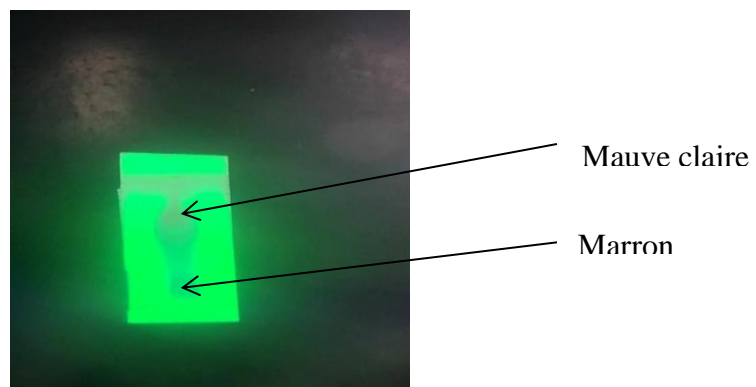


**Figure III-10: Sys 4 : H<sub>2</sub>O/Butanol/éthanol/Acide acétique**

les valeurs de RF pour l'extrait d'acétate d'éthyle sont réunies dans le tableau suivant

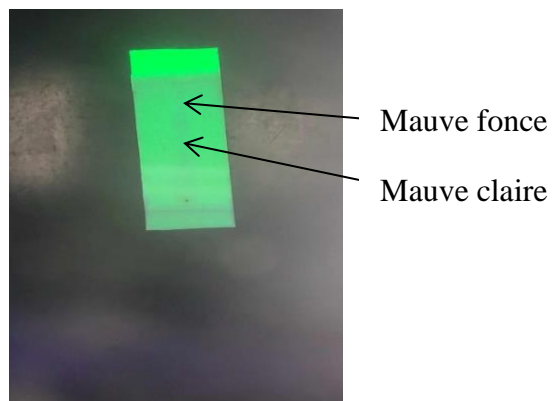
***III.2.2.3. Analyse de l'extrait n-butanol :***

- **Chromatogramme 01 :**



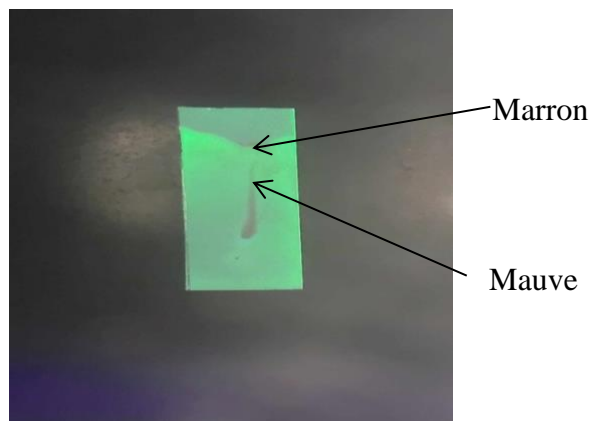
**Figure III-11: Sys 1 : Et<sub>2</sub>O/éthanol**

- **Chromatogramme 2**



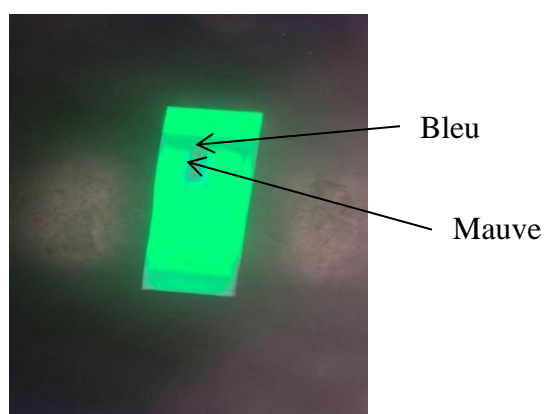
**Figure III-12 : Sys2 : toluène/éthanol/méthyle éthyle cétone**

- **Chromatogramme 03**



**Figure III-13: Sys 3 : H<sub>2</sub>O/méthanol/acétylène acétone**

- **Chromatogramme 04**



**Figure III-14 : Sys 4 : H<sub>2</sub>O/Butanol/éthanol/Acide acétique**

<b>Eluant</b>	<b>volume</b>
Et <sub>2</sub> O / éthanol	(1,9)
Toluène/éthanol/méthyle éthyle cétone	(3, 3,4)
H <sub>2</sub> O/méthanol/Acétyle acétone	(7, 3,1)
H <sub>2</sub> O/Butanol/éthanol/Acide Acétique	(3 et 1.5 et 2et 1)

**Tableau III-2 : la valeur de Rf de l'extrait n-butanol**

On en déduit que la plante est riche en flavonoïdes.



# **CONCLUSION**

## **GENERALE**

## Conclusion générale :

Le but de ce travail est la détection structurale des métabolites secondaires de l'espèce *marrubium vulgare*. L'extraction de ces métabolites secondaires basée sur leur solubilité dans plusieurs solvants organiques de polarités différentes.

Nous avons analysé cette plante et mis en évidence la présence des principes actifs très importants dans le domaine pharmaceutique qui sont les flavonoïdes.

Au cours de notre travail, nous avons séparé à partir de cette espèce deux extrais purs, par deux solvants de polarités croissantes respectivement : l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait n-butanol.

Dans une première étape nous avons fait l'extraction des flavonoïdes, suivi par des tests de chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits en utilisant plusieurs systèmes de solvants , a permis d'avoir une multitude de taches ce qui prouve la richesse des extraits en substances actives essentiellement les poly phénols (flavonoïdes).

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Bibliographies :

- [1] Magliulo E, Carosi PG, Minoli L, et al. (1973). Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silymarin. *Arzneimittelforschung* 23 (Suppl): 161-
- [2] Varma D, Kinoshita JH (1976). Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids—Their possible role in the prevention of diabetic cataracts. *Biochem Pharmacol* 25 (22): 2505-13.
- [3] Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 16: 845-50.
- [4] Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, et al. (1994). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): anti-inflammatory and analgesic activity. *Farmaco* 40 (11): 709-12.
- [5] Rice-Evans CA, Miller NJ (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 24: 790-5.
- [6] Catapano AL (1997). Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology* 48: 39-44.
- [7] Gilani AH, Janbaz KH, Shah BH (1997). Quercetin exhibits hepatoprotective activity in rats. *Biochem Soc Trans* 25 (4): S619.
- [8] Cao G, Sofic E, Prior RL (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22: 749-60.
- [9] Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, et al. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65 (4): 337-53.
- [10] Ursini F, Tubaro F, Rong J, et al. (1999). Optimization of nutrition: polyphenols and vascular protection. *Nutr Rev* 57 (8): 241-9.
- [11] Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, et al. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nut* 74 (4): 418-25.
- [12] Burda S, Oleszek W (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* 49: 2774-9.
- [13] Rice-Evans C (2001). Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 8: 797-807.
- [14] Gonçalves JLS, Leitão SG, Delle Monache F (2001). In vitro antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine* 8 (6): 477-80.
- [15] Havsteen BH (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therap* 96: 67-202.
- [16] Sadik CD, Sies H, Schewe T (2003). Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure–activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol* 65 (5): 773-81.

- [17] Erlund I (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res* 24: 851-74.
- [18] Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, et al. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 500 (1-3): 299-313.
- [19] Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727-747.
- [20] Shin JE, Kim JM, Bae EA, et al. (2005). In vitro inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Planta Med* 71 (3): 197-201.
- [21] Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 99 (1): 191-203.
- [22] Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UATh (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. Review. *J Chromatogr A* 1112: 31-63.
- [23] Portet B (2007). Recherche Bioguidée de Molécules Antipaludiques d'une Plante Guyanaise: *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, p. 23-25.
- [24] Ben segueni A (2007). Etude théorique des métabolites secondaires de végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique (simulation par docking arrimage moléculaire sur la lipoxycgénase et la cyclooxygénase). Thèse de doctorat en Biochimie Appliquée, Université Mentouri Constantine, p. 5.
- [25] Bruneton J (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Tec & Doc (4ème Ed.), 1268 p.
- [26] Chebrouk C (2009). Caractérisations analytiques de quelques composés polyphénoliques et terpéniques issus de la plante *Marrubium deserti* de la région de Ghardaïa. Mémoire de magister en Chimie organique appliquée, Université Kasdi Merbah Ouargla, p. 60.
- [27] Parsaeimehr A, Sargsyan E, Javidnia K (2010). A Comparative Study of the Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Activity and Total Phenolic Compounds Content of Cell Cultures and Plants of Three Endemic Species of *Ephedra*. *Molecules* 15: 1668-1678.
- [28] Aouadhi C, Ghazghazi H, Hasnaoui B, Maaroufi A (2013). Comparaison de l'activité antifongique d'extraits méthanoliques de trois plantes collectées du nord-ouest de la Tunisie. *Microbiol Hyg Alim* 25 (73): 9-14.
- [29] Chinbo M, Moutachakkir M, Khoudri N, Chabaa T, Soraa Z (2014). Ropopuptda et résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* dans un hôpital pédiatrique marocain: implications thérapeutiques. *International Journal of Innovation and Scientific Research* 11 (2): 6Z-E87.

- [30] Boucher MA (2015). Caractérisation chimique et évaluation du potentiel antibactérien des huiles essentielles de *Tussilago farfara* (L.) et de *Tanacetum vulgare* (L.). Thèse de doctorat, Université du Québec à Chicoutimi.
- [31] Hammoudi R (2015). Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien (Thèse de doctorat).
- [32] Linda ACHOURI, Sara ABBAS (2016). Contribution à l'étude du potentiel biologique d'une plante médicinale du genre *Marrubium*. Thèse de doctorat, Université Larbi Tebessi Tebessa.
- [33] Yousra GR (2017). Etude comparative de la variabilité interspécifique: morpho-phénologique et évaluation de l'activité antioxydante et l'activité biologique chez *Triticum durum*, *Triticum aestivum* et *Hordeum vulgare*. Thèse de doctorat, Université de Ghardaïa.
- [34] Hameg T, Taleb D (2018). Evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante des composés phénoliques du Marrube blanc «*Marrubium vulgare*». Thèse de doctorat, Université Mouloud Mammeri.
- [35] Ben Ramdane Ahlem MH (2019). Extraction et activité biologique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas*.
- [36] Halima N (2020). Contribution à l'étude des fractions polaire et apolaire de *Thapsia garganica*. Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah Ouargla.
- [37] Ahlem T, Nour El Islam BEL (2020). Effet protecteur de l'acide alpha-lipoïque contre l'hépatotoxicité induite par l'éthanol.
- [38] Malika MOULAY (2020). Utilisation des métabolites secondaires contre certains bio-agresseurs des plantes cultivées. Thèse de doctorat, Université Ibn Khaldoun-Tiaret.
- [39] Paterson DL . Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. The American journal of medicine, Vol. 34, N°. 5, pp. 20-28 famille lamiacée «*Sideritis incana* l (Doctoral dissertation, Université de kasdi Merbeh-Ouargla).
- [40] BEN RAMDANE Ahlem, M. H. (2020). Extraction et activité biologique des huiles essentielles de  
*Lavandula stoechas*.
- [41] CHELLOUF, R., & BOUGHEZAL, A. Etude photochimique et comparative des méthodes d'extraction et évaluation des activités biologique de quelques plantes sauvages.
- [42] Hameg, T., & Taleb, D. (2020). Evaluation de l'activité antimicrobienne, et antioxydante des composés phénoliques du Marrube blanc «*Marrubium vulgare*» (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- [43] Amira, A. M. R. A. O. U. I. (2020). Composition chimiques et activités antimicrobienne, antioxydante, insecticide et anticancéreuse des huiles essentielles et/ou des extraits de *Marrubium vulgare* et d'*Ammi visnaga* (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem).
- [44] Malika, M. O. U. L. A. Y. (2022). Utilisation des métabolites secondaires contre certains bio-agresseurs des plantes cultivées (Doctoral dissertation, Université Ibn Khaldoun-Tiaret-).

- [45] AHLEM, T., & NOUR EL ISLAM, B. E. N. L. O. U. C. I. F. (2022). Effet protecteur de l'acide alpha lipoiique contre l'hépatotoxicité induite par l'éthanol.
- [46] Hadjar, B. (2022). Contribution à la valorisation des effets biologiques de *Rosmarinus Officinalis* contre l'hépto-toxicité et la néphro-toxicité induite par le propinèbe (Doctoral dissertation, Université Larbi Tébéssi-Tébessa).
- [47] Halima, N. E. B. E. G. (2022). Contribution à l'étude des fractions polaire et apolaire de *Thapsia garganica*L (Doctoral dissertation, Université Kasdi Merbah Ouargla).
- [48] BRAKTIA Dhia Eddine, K. S. Etude préliminaire sur l'effet de *Punica granatum* et du pollend'abeille et du palmier dattier sur un modèle animal du syndrome polykystique ovarien (Doctoral dissertation, Université Echahid Chikh Larbi Tebessi-Tebessa).
- [49] ADAMA, B. (201). LA PRISE EN CHARGE DES TUMEURS DU REIN SELON IBN TOFAIL.
- [50] Yousra, G. R. (2023). Etude comparative de la variabilité interspécifique: morpho-phénologique et évaluation de l'activité antioxydante et l'activité biologique chez *Triticum durum*, *Triticum aestivum* et *Hordeum vulgare*. *Triticum aestivum* et *Hordeum vulgare*.
- [51] Linda, A. C. H. O. U. R. I., & Sara, A. B. B. A. S. (2023). Contribution à l'étude du potentiel biologique d'une plante médicinale du genre *Marrubium* (Doctoral dissertation, Université laarbi tebessi tebessa).
- [52] Boucher, M. A.. Caractérisation chimique et évaluation du potentiel antibactérien des huiles essentielles de *Tussilago farfara* (L.) et de *Tanacetum vulgare* (L.) (Doctoral dissertation, Université du Québec à Chicoutimi). Aouadhi, C., GHAZGHAZI, H., HASNAOUI, B., & MAAROUFI, A.. Comparaison de l'activité antifongique d'extraits méthanoliques de trois plantes collectées du nord-ouest de la Tunisie. *Microbiol. Hyg. Alim*, 25(73), 9-14
- [53] Paterson D. L., -900z Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae *The American journal of medicine*. Vol. 34, N°. 5, pp. 20-28.
- [54] Chinbo M., Moutachakkir M., snoqqoppv A., 1a Khoudri N. Chabaa T et Soraa Z Of Ropoquppta et résistance xnB antibiotiques sèp isolats de sDuowopnèsd aeruginosa suep un hôpital pediatrique marocain: implications thérapeutiques. *International Journal JO Innovation Scientific Research*, Vol. 11,N°.2, pp. 06Z-E87
- [55] Pery JJ, Staley J.T., Lory S., *Microbiologie. Cours et questions de révision*. Dunod. 912 p.
- [56] Lowy F. D. 8661 –*Staphylococcus* infections. *The MN England Journal JOsnøunb Medicine*, Vol. 339, No 8, pp. "LES-OIS
- [57] Parsaeimehr A. Sargsyan E. 1ə Javidnia K., 2010- A Comparative Study of the

Antibacterial, Antifungal pue Antioxidant Activity pue Total Content Jo Phenolic Compounds of Cell Cultures pue PIM Plants JO Three Endemic Species JO Ephedra. *Molecules*, Vol.15, pp.1668-1678



# **Annexes**

# Annexe

## Matériels et produits utilisé

Récipients et Verreries	Accessoires	Produits	Appareillage
<ul style="list-style-type: none"><li>-Ampoule à décanter</li><li>-Ballon un col (500 ml)</li><li>-Büchner</li><li>-Entonnoir simple</li><li>-Eprouvettes graduées</li><li>-Béchers gradués</li><li>-Fioles erlenmeyer</li><li>-Fioles à jaugee</li><li>-Creuser</li><li>-Tubes à essais</li><li>-Boites de pétrie</li><li>.- Cuve</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Support métalliques</li><li>-Pince</li><li>• Spatule en acier</li><li>-Spatule en verre</li><li>-Tuyaux</li><li>. Papier paraffine</li><li>• Papier filtre</li><li>-Verre de montre</li><li>-Thermomètre</li><li>-Plaque de gel de silice</li><li>-séchoir</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Eau distillé</li><li>-Ethanol</li><li>-Méthanol</li><li>-Chloroforme</li><li>-Ether de pétrole</li><li>-Acétate d'éthyle</li><li>-N-Butanol</li><li>-Toluène</li><li>-Méthyl éthyl</li><li>-cétone</li><li>-Eau physiologie</li><li>-Acide acétique</li><li>-Gélose Mueller-</li><li>-Hinton</li><li>-Gélose nutritive</li><li>-Gélose Chapman</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>.Lampe UV</li><li>.- Etuve</li><li>-Bec benzène</li><li>-évaporateur rotatif</li><li>. Autoclave</li></ul>

# Résumé

D'après cette étude phytochimique, les parties aériennes de la plante marrubium vulgare, appartenant à la famille des Lamiaceae, ont été examinées. Cette plante est reconnue pour sa résistance à la sécheresse et son importance pharmacologique mondiale. Les méthodes d'analyse utilisées comprennent la macération et la chromatographie sur couche mince (CCM), qui permettent de détecter certains composés organiques, notamment les flavonoïdes qui se caractérisent par des colorations telles que le marron, le jaune et le violet.

**Les mot clé :** marrubium vulgare, Lamiaceae, flavonoïdes, la chromatographie sur couche mince,

## Abstract

Based on this phytochemical study, the above-ground parts of the plant C. marrubium vulgare, belonging to the family Lamiaceae, were examined. This plant is known for its drought hardiness and global pharmacological importance. The analytical methods used include maceration and thin-layer chromatography (TLC), which can detect certain organic compounds, including flavonoids, which are characterized by stains such as brown, yellow and purple.

**Key words:** marrubium vulgare, Lamiaceae, flavonoids, thin-layer chromatography

## ملخص

بناء على هذه الدراسة الكيميائية النباتية ، تم فحص الأجزاء الهوائية للنبات ماروبيوم الشاع المنتمي إلى عائلة لامياسى ، . يشتهر هذا النبات بصلابته للجفاف وأهميته الدوائية العالمية. تشمل الطرق التحليلية المستخدمة النقع والكروماتوغرافيا ذات الطبقة الرقيقة ، والتي يمكنها اكتشاف بعض المركبات العضوية ، بما في ذلك مركبات الفلافونويد ، والتي تتميز بالبقع مثل البني والاصفر والبنفسجي

**الكلمات المفتاحية** مريود ، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لامياسى



## تصريح شرفي

### خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية لإنجاز بحث

(ملحق القرار 1082 المؤرخ في 2021/12/27)

أنا الممضي أسفله،

السيدة(ة): عبد محمد أمين

الصفة: طالب سنة ثانية ماستر كيمياء تخصص: كيمياء عضوية

الحامل(ة) لبطاقة التعريف الوطنية رقم: 206981676 الصادرة بتاريخ: 2021/09/21

المسجل بكلية: علوم دقيقة وعلوم الحياة قسم: كيمياء

والمكلف بإنجاز أعمال بحث: مذكرة ماستر في الكيمياء

عنوانها: Etude de phyto chimie  
de la plante maritime vulgare

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات المهنية والنزاهة الأكاديمية المطلوبة في إنجاز البحث المذكور أعلاه وفق ما ينص عليه القرار رقم 1082 المؤرخ في 2021/12/27 المحدد للقواعد المتعلقة بالوقاية من السرقة العلمية ومكافحتها.

التاريخ: 2024/06/04

إمضاء المعني بالأمر