



Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen-
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers
Département de Biologie
Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

Mémoire
En vue de l'obtention du diplôme
Master en biologie
Option : Biochimie appliquée
Thème

Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet
hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique
de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* L.

Présentée Par : M^{lle} BENSALAH Fouzia

Soutenue le : 18/ 06/2014

Devant le jury composé de :

- | | | |
|------------------------------------|--------|--------------|
| • M ^r RAHMOUN Nadjib | M.C.B. | Président |
| • M ^{lle} BENARIBA Nabila | M.C.B | Examinatrice |
| • M ^r AZZI Rachid | M.C.B | Promoteur |

Résumé

Ce travail porte sur un screening phytochimique des différentes préparations et une recherche d'effet hémolytique d'extrait brut hydroalcoolique, de la partie aérienne de marrube blanc (*Marrubium vulgare*), récoltée dans la région Fillaoucene wilaya de Tlemcen.

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

Les tests phytochimiques, sur les différentes préparations de la partie aérienne, ont révélé la richesse de cette plante en tanins et en composés réducteurs et la présence des alcaloïdes, des coumarines, des terpénoïdes, des stérols et des triterpènes

De même, Les résultats obtenus d'effet d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *M. vulgare*, préparé par décoction, sur des érythrocytes isolés du sang humain, incubés dans un milieu tampon PBS (pH 7,4) à 37°C), ont montré que cette plante présente un effet toxique très faible, avec un taux d'hémolyse qui ne dépasse pas les 38% à une concentration de 2 mg/ml par rapport à l'hémolyse total.

Mots clés : *Marrubium vulgare*, screening phytochimique, effet hémolytique, cytotoxicité.

Abstract

This work deals with a phytochemical screening of different preparations and a search for crude extract alcoholic hemolytic effect of the aerial part of white horehound (*Marrubium vulgare*), harvested in the region Fillaoucene Tlemcen.

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

Phytochemical tests on the different preparations of the aerial part, revealed the richness of this plant tannins and reducing compounds and the presence of alkaloids, coumarins, tepénoïdes, sterols and triterpenes

Similarly, the results of the effect of the hydroalcoholic crude extract of aerial part of *M. vulgare* prepared by decoction, isolated on erythrocytes of human blood incubated in a buffer medium PBS (pH 7.4) at 37 ° C) showed that this plant has a very low toxicity, with a hemolysis rate not exceeding 38% at a concentration of 2 mg / ml with respect to total haemolysis.

Keywords: *Marrubium vulgare*, phytochemical screening, hemolytic effect cytotoxicity.

ملخص

يركز هذا العمل على التحليل الكيميائي النباتي لمختلف تحضيرات المستخلصات ، و بحث التأثير على حاة الدم للمستخلص المائي الكحولي للجزء اللوي للنبتة النعنع الأبيض ، جمعت من منطقة فلاوسن ولاية تلمسان النعناع الأبيض نبات من عائلة الشفوية، عشبة معمرة عفوية تتواجد في منطقة البحر ابيض المتوسط . كشفت الإختبارات لمختلف المستخلصات ثراء النباتة لمادة العفص و السكريات الرجعية مع وجود الألكلويدات و الكومارين.

بالمثل نتائج المستخلص المائي الكحولي للجزء العلوي للنبتة بواسطة النقع على كريات الدم الحمراء المعزولة من دم الإنسان محتضنة في وسط عازل (7.4) عند درجة حرارة 37° مئوية، أظهرت أن هذه النباتة تحتوي على سمية منخفضة جدا، مع معدل انحلال الدم لا تتجاوز 38%. بتركيز 2 ملغ / مل فيما يتعلق مجموع انحلال الدم

الكلمات المفتاحية: النعناع الأبيض، التحليل الكيميائي النباتي، تأثير انحلال الدم، السمومية.

Table des matières

Table des matières	I
Liste des tableaux	V
Liste des figures	VI
Introduction	01

Synthèse bibliographique

1. Plante médicinale	02
2. Les métabolites secondaires	03
2.1. Classification des métabolites secondaires	03
2.1.1. Les tanins	04
2.1.1.1. Tanins hydrolysables	04
2.1.1.2. Tanins condensés	04
2.1.2. Les flavonoïdes	04
2.1.3. Les coumarines	04
2.1.4. Les alcaloïdes	05
2.1.5. Les saponosides	05
2.1.6. Les terpenoïdes	05
2.1.7. Les quinones	05
3. Etude de la toxicité des plantes	06
3.1. La recherche de la toxicité des plantes	06

3.2. Etude de la toxicité	07
3.2.1. <i>In vivo</i>	07
3.2.2. <i>In vitro</i>	09
4. L'hémolyse	09
4.1. Le globule rouge	09
4.2. L'hémolyse intratissulaire	09
4.3. L'hémolyse intravasculaire	10
4.4. L'hémolyse pathologique	10
5. La plante étudiée	11
5.1. <i>Marrubium vulgare</i>	11
5.2. Classification botanique	11
5.3. Description morphologique	12
5.4. Répartition géographique	12
5.5. Utilisation traditionnelle	12
5.6. Toxicité	12

Matériels et méthodes

I. Etude phytochimique	13
1. Le matériel végétal	13
2. Préparation des extraits	13

2.1. Infusion en milieu aqueux	14
2.2. Macération en milieu aqueux	14
2.3. Décoction en milieu aqueux	14
2.4. Décoction en présence éther de pétrole	14
2.5. Décoction hydroalcoolique	14
3. Screening phytochimique	15
II. Evolution de l'effet hémolytique	17
1. Préparation de PBS (phosphate buffered saline)	17
2. Préparation de la suspension érythrocytaire	17
3. Préparation des extraits	17
4. L'effet hémolytique	18
III. Etude statistique	19

Résultats et interprétation

I. Etude phytochimique	21
I Evolution de l'effet hémolytique	23
Discussion.....	26

Conclusion	28
Références bibliographiques	29
Annexe	35

Liste des tableaux

- Tableau 01** : Tests phytochimiques des extraits aqueux et en présence de solvant (éther de pétrole) de la partie aérienne (feuille et tige) du *Marrubium vulgare* préparés par infusion, décoction et macération**21**
- Tableau 02** : Les tests phytochimiques [Trease et Evans, 1989 ; Harborne, 1998].....**37**
- Tableau 03** : L'évolution de l'absorbance des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extraits brut hydroalcoolique de *M. vulgare* à 37°C durant 1 heure à 548nm**40**
- Tableau 04** : L'évolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations d'extraits brut hydroalcoolique de *M. vulgare* après 1 heure d'incubation par rapport à l'hémolyse total.....**40**

Liste des figures

Figure 01 : <i>Maruubium vulgare</i>	11
Figure 02 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de <i>M. vulgare</i> , incubé à 37 °C durant 1 heure, à 548nm.....	23
Figure 03 : Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de <i>M. vulgare</i> , après 1 heure d'incubation par rapport à l'hémolyse totale.....	24
Figure 04 : Diagramme montrant les différentes préparations des extraits.....	36

A travers le temps, l'homme a pu compter sur la nature pour assurer ses besoins de base: nourritures, vêtements et également pour ses besoins médicaux.

L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité.

En 20^{ème} siècle la mise au point des molécules de synthèse, a été consacrée à la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs de sources naturelles a résulté dans la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commence à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines.

Dans le monde, 80% des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner et traiter certains maladies (diabète, cancer, la grippe, hypertension,...) [Marles et Farnsworth, 1996]

En Algérie, comme dans tous les pays du Maghreb et les pays en voie de développement, le recours à la médecine traditionnelle est largement répandu, et plusieurs remèdes à base de plantes utilisés individuellement ou en combinaison sont recommandés [Azzi, 2013].

Les plantes médicinales malgré leurs effets thérapeutiques doivent être utilisées avec la plus grande prudence car elles peuvent avoir un risque de toxicité [Fouché et al, 2000].

Marrubium vulgare L., famille des Lamiacées communément connu par le nom Marriouth ou Marrube blanc, c'est une plante spontanée très répandue dans la région méditerranéenne. Elle est très utilisée en médecine traditionnelle pour des fins thérapeutiques. Elle est utilisée pour le traitement de diabète [Azzi, 2014], la dyspepsies et la perte d'appétit [Djahria et al., 2013]. Elle est utilisée pour le traitement des difficultés respiratoire, des bronchites et de la coqueluche [bellakhdar, 1997].

Dans ce cadre, notre travail porte sur une étude phytochimique préliminaire des différentes préparations de la partie aérienne de *Marrubium vulgare*, ainsi une étude de la cytotoxicité, *in vitro*, basé sur l'effet hémolytique de différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* préparé par décoction.

1. Les plantes médicinales :

Les plantes médicinales sont des plantes dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses [Omar et Mohammed, 1993].

Elles sont impliquées dans différents secteurs sous formes de principes actifs, des huiles, des extraits, des solutions aqueuses ou organiques ou même telles qu'elles sont [Ahmed, 1995]. Elle contient, au niveau de ses organes, un ou plusieurs principes actifs utilisables à des fins thérapeutiques. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses [Farnsworth et al, 1986].

Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne [Elqaj et al, 2007]

Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la pharmacie des médicaments très efficaces. Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie. Ils montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part seraient quasiment dépourvues de toxicité [Gurib-Fakim, 2006].

L'ethnopharmacologie et l'ethnobotanique ont pour finalité la compréhension des pratiques et des représentations relatives à la santé, à la maladie, et la description, l'évaluation thérapeutique des plantes utilisées dans les pharmacopées traditionnelles.

L'usage empirique des différentes préparations traditionnelles des plantes est donc extrêmement important pour une sélection efficace de plantes puisque la plupart des métabolites secondaires de plantes employées en médecine moderne [Gurib-Fakim, 2006].

2. Les métabolites secondaires :

Les plantes produisent un grand nombre de composés pour lesquels on ne sait pas toujours le rôle qu'ils jouent exactement pour la plante.

Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. On les appelle donc des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont un groupe de molécules qui interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux. La défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents allélopathiques et pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits [Judd et al., 2002].

Il existe plus de 200.000 composés connus qui ont des effets antinutritionnels et toxiques chez les mammifères. Comme ces composés ont des effets toxiques, leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections viral...), car la différence entre toxicité et effet bénéfique est généralement la dose dépendant ou structure [Makkar et al, 2007].

Parmi ces composés, nous citons : les composés phénolique (les tanins, les flavonoïdes, coumarines), alcaloïdes, saponosides, terpénoïdes, quinone,...

2.1. Classification des métabolites secondaires :

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variés, d'origine secondaire qui dérivent du phénol C_6H_5OH qui est un monohydroxybenzène. Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal ; on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. La couleur et l'arome, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Ces composés représentent 2 à 3% de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10% et même d'avantage. Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins) [Walton et Brown, 1999].

2.1.1. Les tanins :

Sont des composés polyphénoliques, ayant la capacité de précipiter les protéines. Ils sont présents essentiellement dans les écorces. Ils forment, après coagulation, des composés très stables et les protéines. Ils ont pour effet principal, pour les plantes, de les rendre peu digestibles [Paris et Hurabielle, 1981], ils sont de deux classes :

2.1.1.1. Tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques, et les tanins ellagiques [Paris et Hurabielle, 1981].

- **Tanins galliques (Gallo tanins) :** Ils donnent par hydrolyse des oses et de l'acide gallique [Paris et Hurabielle, 1981].

- **Tanins ellagiques (Ellagitanins) :** Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique [Paris et Hurabielle, 1981].

2.1.1.2. Tanins condensés :

Les tanins condensés sont des molécules non hydrolysables et sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine [Khanbabaea et Ree, 2001], leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre [Paris et Hurabielle, 1981].

2.1.2. Les flavonoïdes :

Représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [Rice et al., 1998].

Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune. Ils comprennent les flavonoïdes au sens strict (flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavylum, chalcones, aurones) et les isoflavonoïdes [Cseke et al., 2006].

2.1.3. Les coumarines :

Sont de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses.

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes [Madhavi et al, 1996].

2.1.4. Les alcaloïdes :

Sont des substances basiques, contenant un atome ou plus d'azote généralement inclus dans un système hétérocyclique. On distingue les alcaloïdes sels et les alcaloïdes bases [Guignard et al., 1995 ; Harbone, 1998 et Bruneton, 1999].

2.1.5. Les saponosides:

Sont des substances hétérosidiques à propriétés tensioactives ; selon la nature de la génine, On distingue deux groupes : les saponosides à génine stéroïdique et les saponosides à génine triterpénique. [Guignard et al., 1995 ; Harbone, 1998 et Bruneton, 1999].

2.1.6. Les terpénoides:

Sont des composés par l'assemblage d'un nombre entier d'unité pentacarbonée ramifiée ; le 2-méthyl- butadiène (isoprène), selon le nombre d'unité isoprénique qui les constituent, on distingue : les monoterpènes en C₁₀, les sesquiterpènes en C₁₅, les diterpènes en C₂₀ et les triterpènes en C₃₀, ... [Guignard et al., 1995 ; Harbone, 1998 et Bruneton, 1999].

2.1.7. Les quinones :

Sont des composées oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques. Les quinones peuvent être classées en quatre groupes : benzoquinones, naphthoquinones, anthraquinones et isoprénoïdes quinones [Guignard et al., 1995 ; Harbone, 1998 et Bruneton, 1999].

3. Etude de la toxicité des plantes :

La toxicologie est l'étude des substances toxiques et plus précisément, l'identification et l'évaluation quantitative des conséquences néfastes liées à l'exposition à des agents physiques, chimiques ou de toute autre nature [Silbergeld, 2000]. Comme telle, elle fait appel, tant pour ses connaissances que pour sa démarche de recherche ou ses méthodes, à la plupart des sciences biologiques fondamentales, aux disciplines médicales, à l'épidémiologie et à divers domaines de la chimie et de la physique. Elle s'étend de la recherche fondamentale sur le mécanisme d'action des agents toxiques à la mise au point et à l'interprétation de tests normalisés permettant de caractériser les propriétés toxiques de ces agents [Lapointe, 2004].

3.1. La recherche de la toxicité des plantes :

Les plantes contiennent des mélanges complexes de terpènes, alcaloïdes, des saponines et d'autres substances chimiques. Ce qui augmente le risque de réactions indésirables par leurs effets additifs ou synergiques des interactions chimiques [Trevoux et al., 2000 ; Saad et al., 2006].

Classiquement, en présence d'une substance inconnue la première étape dans la recherche d'une activité pharmacologique débute par l'étude de la toxicité et en particulier par l'évaluation de la dose létale 50 (DL50) [Rolland, 1988].

Cette technique, apporte néanmoins des renseignements de qualité :

- Elle détermine en premier lieu la toxicité de la substance ainsi que la marge thérapeutique, c'est-à-dire le rapport entre la dose active et la dose toxique pour l'espèce animale testée ; c'est une étape indispensable à l'utilisation de toutes substances à des fins thérapeutiques.
- L'observation des premiers symptômes de la toxicité des organes cibles, c'est-à-dire ceux qui sont préférentiellement atteints par la toxine; la toxicité est d'ailleurs un excellent critère d'orientation de la recherche d'activité pharmacologique [Rolland, 1988].

3.2. Etude de la toxicité :

Selon la durée, la fréquence et la quantité de produits toxiques auxquelles un individu est exposé, on observe plusieurs types de toxicités [Alain, 2002]. L'homme est constamment exposé à une toxicité soit aiguë soit subaiguë ou encore chronique [Bismuth et al, 1987].

3.2.1. *In vivo* :

S'adressant à un animal entier vivant, particulièrement adaptée pour la mise en évidence d'un effet global. L'inconvénient majeur de ces techniques est l'utilisation d'un grand nombre d'animaux vivants qui ne servent que pour une seule expérimentation : chaque extrait est expérimenté à plusieurs doses chaque dose représente un lot de 10 à 20 animaux : de plus il est nécessaire d'y adjoindre un lot témoin recevant un produit de référence [Rolland, 1988].

➤ Etude de la toxicité aiguë (détermination de la dose létale DL100 et DL50) :

- **La dose létale DL100** : C'est la dose qui entraîne la mort de la population des animaux d'essais. La **DL100** est un indice de létalité qui mène à mentionner le degré de toxicité d'un produit chimique donné [Bonvalot, 2002].
- **La dose létale DL50** : La dose létale médiane (**DL50**) est la valeur statistique d'une substance chimique qui provoque la mort de 50% d'une population donnée dans des conditions expérimentales définies [Laigneau, 2000].

C'est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après administration unique de la ou des substances actives contenus dans le médicament. Cette étude décrit les symptômes observés et fournit pour autant que cela soit possible l'indication de la dose létale **50 (DL50)** [Ruckebusch, 1981].

Cette dose sert souvent de point de départ des études de toxicité, car elle fournit un minimum de connaissances [CSST, 2004].

L'étude sur les animaux de laboratoire doit porter sur un nombre égal de mâles et de femelles (Pour les rongeurs, chaque groupe doit comprendre au moins cinq animaux par sexe.

Pour les autres espèces, chaque groupe doit comprendre au moins deux mâles et deux femelles).

La durée de l'observation des animaux est fixée par l'expérimentateur. En générale, elle n'est pas inférieure à une semaine [**Ruckebusch, 1981 ; OMS, 2000**].

➤ **Etude de la toxicité subaiguë et la toxicité chronique :**

- **Toxicité subaiguë :** Elle consiste à étudier les conséquences néfastes de l'administration répétée du produit étudié. Le produit est administré quotidiennement, une ou deux fois par jour, pendant une durée de 90 jours en général [**Laroche, 2001 ; Montgomery, 1990**].

Les expérimentations se font sur deux espèces de mammifère dont un rongeur et un non rongeur (Pour les rongeurs, chaque groupe doit comprendre au moins dix animaux par sexe. Pour les autres espèces chaque groupe doit comprendre au moins trois mâles et trois femelles) [**Ruckebusch, 1981 ; OMS, 2000**].

Les observations doivent porter sur l'aspect général, le comportement, la croissance et mortalité. Dans certains cas, il peut être indiqué de faire une estimation de la quantité d'aliments consommés, d'étudier la chimie du sang et de l'urine, et de pratiquer des explorations fonctionnelles de certains organes. L'étude des organes doit comprendre un examen macroscopique et microscopique et la mesure des poids relatifs des organes dans les groupes d'épreuve et dans les groupes témoins. Dans de nombreux cas, les organes les plus importants à observer de façon détaillée sont le foie et le rein [**Shubik et Sicé, 1956 ; Truhaut, 1956**].

- **Toxicité chronique :**

Elle permet de caractériser le profil toxicologique d'une substance chez les animaux, à la suite d'une exposition répétée et prolongée au-delà de 90 jours.

Dans ce cas, le produit est administré quotidiennement, une à deux fois par jour pendant 18 à 24 mois. Le protocole expérimental est similaire à celui utilisé pour la toxicité subaiguë, sauf que la période est plus longue [**Laroche, 2001**].

Il est habituel de mettre fin au bout de deux ans aux expériences à long terme sur les animaux, car on considère ordinairement que cette durée couvre la plus grande partie de leur vie [Schubik et Sicé, 1956 ; Truhaut, 1956].

3.2.2. *In vitro* :

Dites de substitution, qui représente un premier avantage, celui de diminuer fortement la consommation d'animaux vivants, posent d'emblée un problème de fond : celui de la confrontation entre un mélange complexe, d'autre part la réponse biologique diffère d'une cellule artificiellement isolé de son environnement normal par rapport à une cellule au sein d'un organe dans lequel elle maintient des interactions constantes avec les cellules voisines ou avec tout l'organisme [Rolland, 1988].

4. L'hémolyse :

L'hémolyse est le phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits et libèrent leur hémoglobine [Aguilar-Martinez, 2007].

4.1. Le globule rouge :

Le globule rouge, cellule mature de la lignée érythrocytaire, a la forme d'une lentille biconcave. Son diamètre est de 7 μ m. La forme particulière du globule rouge lui permet d'avoir une plus grande surface par rapport à son volume que la forme sphérique, ce qui favorise les échanges d'oxygène. La durée de vie moyenne des globules rouges est de 120 jours [Aguilar-Martinez, 2007].

4.2. L'hémolyse intratissulaire :

Les globules rouges âgés, après une durée de vie normale de 120 jours, sont phagocytés par les macrophages de système de phagocytes mononuclées. Chez le sujet normal, la majorité des globules rouges sont détruits dans les macrophages de la moelle osseuse (minimum 50%).

Le reste de l'hémolyse se répartit dans l'organisme, en particulier dans la rate et le foie. [Aguilar-Martinez, 2007].

Cette phagocytose porte sur des globules rouges dont le vieillissement s'est traduit par :

- Des modifications biochimiques : diminution du contenu enzymatique, ralentissement métabolique, perte des lipides membranaire, phénomènes oxydatifs.
- Des modifications morphologiques (tendance à la sphéricité par réduction de la surface membranaire et/ou hyperhydratation).
- Des modifications de la plasticité (diminution de la déformabilité des globules rouges entraînant une stagnation dans les capillaires) [Aguilar-Martinez, 2007].

4.3. L'hémolyse intravasculaire :

Une faible partie de l'hémolyse physiologique se déroule au sein même de la circulation sanguine. Dans ce cas l'hémolyse est libérée dans le plasma où elle forme un complexe avec l'haptoglobine, synthétisée par le foie. Ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'hémoglobine est dégradée. [Aguilar-Martinez, 2007].

4.4. L'hémolyse pathologique :

Elle peut être due à deux mécanismes principaux :

- Soit une anomalie du globule rouge : hémolyses corpusculaires ou globulaires.
- Soit à une agression extrinsèque des hématies : hémolyse extracorporelles [Aguilar-Martinez, 2007].

5. La plante étudiée:

5.1. *Marrubium vulgare* L. :

En Arab est connue par le nom Marrioua [Al kadi, 1989] Au Maroc c'est Merrîwt [Novak et al, 1966], un autre en Tunis Marroubia [Bellakhdar, 1997], en français : Marrube blanc et en Anglais : Harehound, En Italien : Marrubio [Quezel et Santa, 1962, 1963]



Figure 1: *Marrubium vulgare*

5.2. Classification botanique : Selon [APG III].

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

5.3. Description morphologique:

Le marrube blanc 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. 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 [Aouadhi, 2010].

5.4. Répartition géographique :

Cette plante est commune dans toute l'Algérie et presque dans toute l'Europe en dehors de l'extrême Nord, Australie et New Zélande [Baba aissa, 1999].

Elle se trouve aussi au Maroc et en Tunisie, surtout en région méditerranéenne [Bonnier, 1990].

5.5. Utilisation traditionnelle :

Le marrube blanc est prescrit dans le traitement des difficultés respiratoires, des bronchites, des bronchectasies, des bronchites asthmatiformes des toux sèches et de la coqueluche. Il fluidifie les mucosités. La décoction est employée comme antidiabétique [Bellakhdar, 1997].

Le *Marrubium vulgare* est indiqué pour les dermatoses, eczéma chronique, hystérie [valnet, 1983].

5.6. Toxicité :

C'est une plante amère à caractère salin et ne peut donc pas être toléré s'il ya une gastroentérite ou des situations de nausées ou de vomissements ou encore en cas de dyspepsie [Aouadhi, 2010].

Notre travail porte sur une étude phytochimique des différentes préparations de la partie aérienne du Marrube blanc : *Marrubium vulgare* (feuilles et tiges) et une étude biologique de la cytotoxicité, *in vitro*, basée sur l'hémolyse des globules rouges à différentes concentrations d'extrait hydroalcoolique brut de cette plante préparé par décoction.

Pour cela, cette partie expérimentale a été réalisée au sein de laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, physico-chimie, synthèse et activité biologique », département de biologie, Faculté SNV STU, université de Tlemcen :

I. Etude phytochimique

1. Le matériel végétal

La partie aérienne (feuilles et tiges) de *Marrubium vulgare* a été récoltée dans la région de Fillaoucene wilaya de Tlemcen au mois de février 2014.

Au laboratoire, la partie aérienne récoltée a été découpée en petites morceaux et séchée à l'ombre dans un endroit bien aéré, à une température ambiante et à l'abri de la lumière, pour préserver le maximum l'intégrité des molécules.

Le matériel végétal préparé soumis à des extractions afin d'extraire les différentes classes de composés chimiques contenues dans la plante, pour des tests phytochimiques et biologiques.

2. Préparation des extraits :

Les extractions solide / liquide de cette plante ont été réalisées selon trois modes de préparation : infusion, décoction et macération.

2.1. Infusion en milieu aqueux:

- Verser 100ml d'eau distillée bouillante sur 5g du matériel végétal.
- Agiter et laisser le mélange refroidir.
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

2.2. Macération en milieu aqueux :

- Dans un Erlenmeyer, mettre 5g du matériel végétal avec 100ml d'eau distillée, sous agitation, à une température ambiante, pendant 24h.
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

2.3. Décoction en milieu aqueux :

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant et à l'aide d'une plaque chauffante sous agitateur.

- Mélanger 5g du matériel végétal avec 100ml d'eau distillée.
- Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 1 heure.
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

2.4. Décoction en présence éther de pétrole:

- Mélanger 5g de matériel végétal avec 100ml d'éther de pétrole.
- Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 1 heure.
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

2.5. Décoction hydroalcoolique :

- Ajouter à 100ml du mélange méthanol- eau (70/30), 5g du matériel végétal.
- Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 1 heure.
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.
- Évaporer le solvant et récupérer le filtrat par Rotavapor.

3. Screening phytochimique :

Les tests phytochimique ont été réalisés sur les extraits préparés de la plante en milieu aqueux (décoction, infusion et macération) et en milieu organique (décoction en milieu étheré), par des techniques de caractérisation qualitatives, selon les méthodes décrites par **Trease et Evans, (1989) et Harborne (1998)**

Les résultats obtenus ont été évalués comme suit :

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement Positif ; - : Négatif ; ND : Non déterminé.

➤ Les alcaloïdes :

Dans deux tubes à essai, introduire 1ml de l'extrait à analyser. Acidifier le milieu par quelques gouttes de HCl et ajouter quelques gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube et quelques gouttes de réactif de Wagner dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement révèle la présence d'alcaloïdes.

➤ Les substances polyphénoliques :

✚ Les tanins :

Dans un tube à essai, introduire 5ml d'extrait à analyser et ajouter 1ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 2%, la présence des tanins est indiqué par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

✚ Les flavonoïdes :

Ajouter dans un tube à essai, 5ml d'extrait à tester, quelques gouttes de HCl et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose ou rouge ou jaune prouve la présence des flavonoïdes.

✚ Les coumarines : Fluorescence UV

Introduire 1 ml d'extrait dans un tube, ajouter 0,5 ml de NH_4OH à 25 %, mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

➤ Les saponines : test de mousse

Dans un tube à essai, introduire 2ml de l'extrait à analyser, ajouter 2ml d'eau distillée chaude, agiter pendant 15secondes et laisser le mélange au repos pendant 15min. Une hauteur supérieure à 1 cm d'un mousse indique la présence de saponines.

➤ Stérois et triterpènes : La réaction de Lieberman Burchardt

Dans un bécher, introduire 5ml de l'extrait à analyser, ajouter 5ml d'anhydride acétique, 5ml de chloroforme et 1 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré dans la paroi de bécher sans agiter. Laisser reposer 20 min. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérois et triterpènes.

➤ Les composés réducteurs :

Dans un tube à essai, ajouter 1ml de liqueur de Fehling (0,5ml réactif A et 0,5ml réactif B) à 1ml d'extrait à analyser et incubé l'ensemble 08 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

➤ Antraquinones libres : Réaction de Borntrager

Dans un tube à essai, ajouter à 5ml de l'extrait, 2,5ml de NH_4OH à 20% puis agiter. Une coloration plus ou moins rouge indique la présence d'antraquinones libres.

➤ **Terpénoïdes : Test de Slakowski**

Dans un tube à essai, ajouter à 2,5ml d'extrait, 0,4ml de chloroforme et 0,6ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

II. Evolution de l'effet hémolytique

Le test de l'effet hémolytique d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *M. vulgare* a été réalisé, *in vitro*, sur une suspension érythrocytaire du sang humain, incubée dans un tampon phosphate saline (PBS), pH 7,4.

1. Préparation de PBS (phosphate buffered saline):

Nous avons préparé une solution tampon phosphate saline (PBS) à $\text{pH} = 7,4 \pm 0,02$ par l'utilisation des composés suivants avec les concentrations qui correspondent : NaCl (137mM), KCl (2,7mM), Na_2HPO_4 (8mM), KH_2PO_4 (2mM) [Mohan, 2006].

2. Préparation de la suspension érythrocytaire :

- Le sang est prélevé dans un tube héparine à partir d'un donneur sain ;
- Le sang est centrifugé à 2400 tour / minute durant 10 min;
- Le plasma (surnageant) est éliminé et le culot est lavé 2 fois par du PBS ;
- Le culot, ainsi obtenu, est resolubilisé à nouveau par le même volume de plasma éliminé;
- La suspension érythrocytaire, ainsi obtenue, est diluée 20 fois par PBS.

3. Préparation des extraits :

Les différentes concentrations d'extraits hydroalcoolique sont préparées dans du PBS. Les concentrations initiales préparées sont (50mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml et 200mg/ml)

4. L'effet hémolytique :

Le test d'effet hémolytique de la plante étudié est réalisé selon la méthode de **Guo-Xiang et Zai-Qun (2008)**.

- Mettre dans des tubes à hémolyse 2970µl de la suspension érythrocytaire préparé avec 30µl de l'extrait à différentes concentrations initiales (50mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml et 200mg/ml). Les concentrations finales après ajout du PBS seraient (0,5mg/ml, 1mg/ml, 1,5mg/ml et 2mg/ml).
- Incuber les tubes dans l'incubateur agitateur à 37°C durant 60 min ;
- Prélever 500 µl chaque 15 min durant 60 min (0, 15, 30 et 60 min) ;
- Ajouter 1,5 ml de PBS ;
- Mélanger les tubes délicatement ;
- Arrêter la réaction avec un bain glaçon ;
- Centrifuger les tubes à 2400 tour / minute durant 10min ;
- Lire l'absorbance (la fuite d'hémoglobine) de chaque tube à 548nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible double faisceau (SPECTROD® 200 PLUS, Analytique Jena), contre un blanc contenant du PBS.

Un tube témoin négatif est préparé dans les mêmes démarches expérimentales. Il est composé de 500 µl de suspension érythrocytaire et 1500 µl de solution tampon de PBS, en absence d'extrait.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, nous avons préparé un tube d'hémolyse totale qui contient 250 µl de la suspension érythrocytaire et 4750 µl d'eau distillé, en absence d'extrait.

Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, après 60 min d'incubation, selon la formule suivant :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{A(\text{extrait 60 min}) - A(\text{témoin négatif 60min})}{A(\text{hémolyse totale 60min})} \times 100$$

Ces tests sont répétés 4 fois, dans le but de réaliser une analyse statistique (Moyenne, écart type et test Student)

1. Analyses statistiques

Les calculs statistiques sont souvent utiles aux biologistes pour la détermination des valeurs normales ou plus exactement des valeurs de référence. Comme pour l'évaluation de précision et l'exactitude d'analyse.

1.1. La moyenne

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_i x_i$$

1.2. L'écart-type

$$\sigma_x = \sqrt{V_x}$$

1.3. Test de Student

Dans ce test les moyennes d'absorbance des tubes à différentes concentrations d'extraits, incubées à 60 min, sont comparées au temps 0 min. Pour comparer les deux moyennes on applique le teste de Student, à ν degrés de liberté qui dépend de la taille de l'échantillon :

$$\nu = d.l.l = n_1 + n_2 - 2$$

$$t_e = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\sigma^2 \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}}$$

La valeur de « t » nous donne le degré de signification « p » lu sur la table de Student. La différence entre deux moyennes est :

Peu significative : $P < 0.05$ (*) ;

Significative : $P < 0.01$ (**) ;

Très significative : $P < 0.001$ (***) ;

Hautement significative : $P < 0.0001$ (****) [Schwartz, 1992].

I. Etude phytochimique :

Les tests phytochimiques sont réalisés sur les extraits de la partie aérienne de *Marrubium vulgare*, préparés dans différents solvants (eau, éther de pétrole) par différentes modes de préparation (infusion, décoction et macération). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 01 :

Tableau 01 : Tests phytochimiques des extraits aqueux et en présence de solvant (éther de pétrole) de la partie aérienne (feuille et tige) du *Marrubium vulgare* préparés par infusion, décoction et macération.

Les tests phytochimiques		Partie aérienne <i>Marrubium vulgare</i>			
		Extrait aqueux			Extrait étheré
Métabolites secondaires	Réactifs	Infusion	Décoction	Macération	Décoction
Tanins	FeCl ₃	+++	+++	+	-
Flavonoïdes	Mg ⁺⁺	-	-	-	-
Alcaloïdes	Mayer	-	+	+	-
	Wagner	-	-	-	-
Coumarines	Fluorescence UV	-	++	-	-
Composés réducteurs	Liqueur de Fehling	+++	+++	++	ND
Stérols et triterpènes	Réaction de Lieberman et Burchardt	+	+	-	ND
Saponines	Test de mousse	-	-	-	-
Terpénoides	Test de Slakowski	-	+	-	
Anthraquinones libres	NH ₄ OH	-	-	-	-

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

ND : non déterminé

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaire (Tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, les composés réducteurs, les coumarines, stérols et triterpènes et anthraquinones libres) au niveau des tissus végétaux de la plante étudiée. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation, un changement de couleur ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Les résultats obtenus des tests phytochimiques, des différentes préparations de la partie aérienne du *M. vulgare*, ont révélé la richesse de cette plante en tanins et en composés réducteurs et des coumarines dans les différentes préparations aqueuses et la présence des alcaloïdes, des tepénoïdes, des stérols et des triterpènes seulement dans l'extrait préparé par décoction en milieu aqueux.

Par contre, les tests des saponines et des anthraquinones libres sont marqué négatif dans les différentes préparations.

De même, nous avons enregistré que l'extrait étheré est très pauvre en métabolites secondaires.

II. Evolution de l'effet hémolytique

La figure 02 présente l'évolution de l'effet hémolytique, par absorbance, durant 60 min, dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, et en présence des différentes concentrations de l'extrait hydroalcoolique, préparé par décoction, de la partie aérienne du marrube blanc (*M. vulgare*) (0,5mg/ml, 1mg/ml, 1,5m/ml et 2mg/ml) , comparée à un tube témoin négatif (tube contenant que de PBS et la suspension érythrocytaire), et un tube d'hémolyse total provoqué par l'eau distillée.

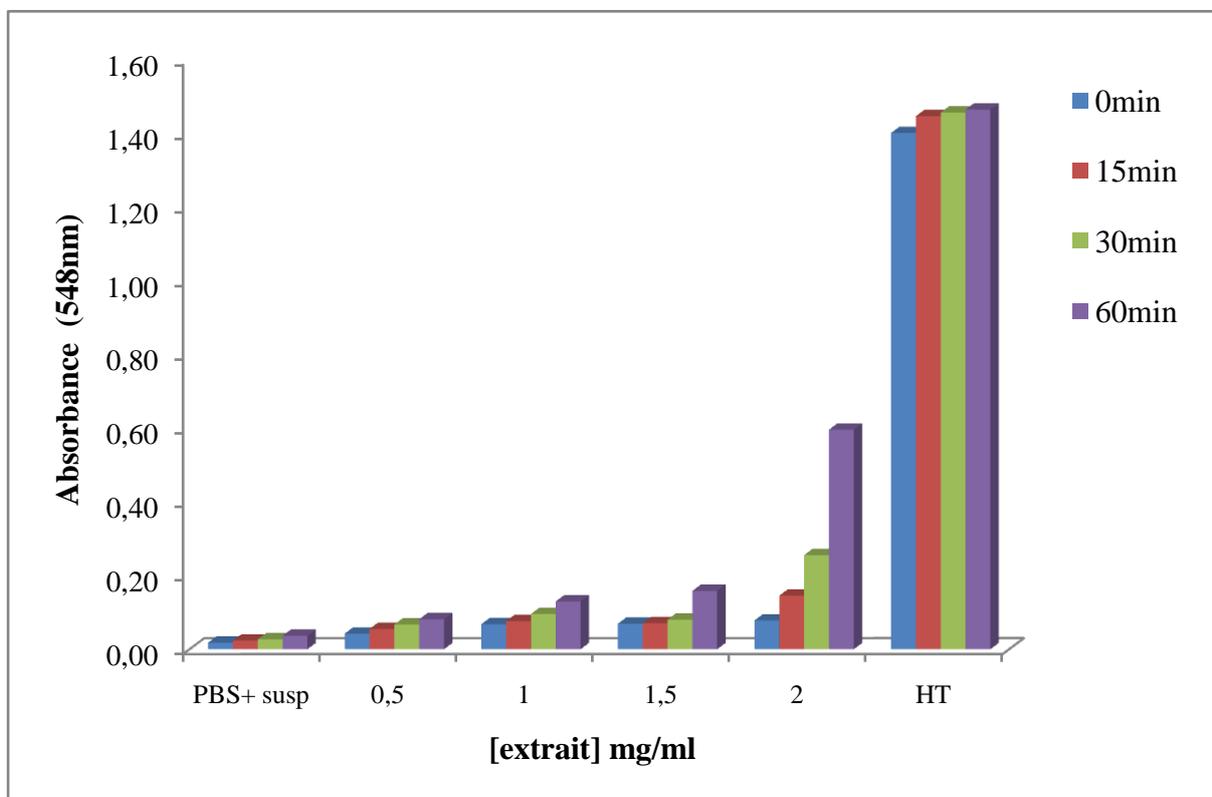


Figure 02 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *M. vulgare*, incubé à 37 °C durant 60 min, à 548nm.

PBS+ susp : témoin négatif ; HT : hémolyse total.

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré des augmentations des absorbances (taux d'hémolyse) durant les 60 min d'incubation des érythrocytes isolés dans du PBS (pH 7,4) en présence des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique du *M. vulgare*. Ces augmentations enregistrées sont non significative par rapport à l'absorbance des tubes dans le temps 0min (Figure 02).

De même, nous avons noté que les absorbances augmentent aussi en fonction des concentrations, mais elles ne dépassent pas une valeur de 0,60 pour une concentration finale de 2mg/ml à 60min d'incubation. Cette valeur est largement inférieure par rapport à l'absorbance de tube d'hémolyse total, qui dépasse 1,46 à 60min dans les mêmes conditions.

La figure 03, présente les taux d'hémolyse, par pourcentage (%) après 60 minutes dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations d'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *M. vulgare* (0,5 ; 1 ; 1,5 et 2mg/ml), préparées par décoction, par rapport au tube d'hémolyse total contenant la suspension érythrocytaire dans un milieu hypotonique.

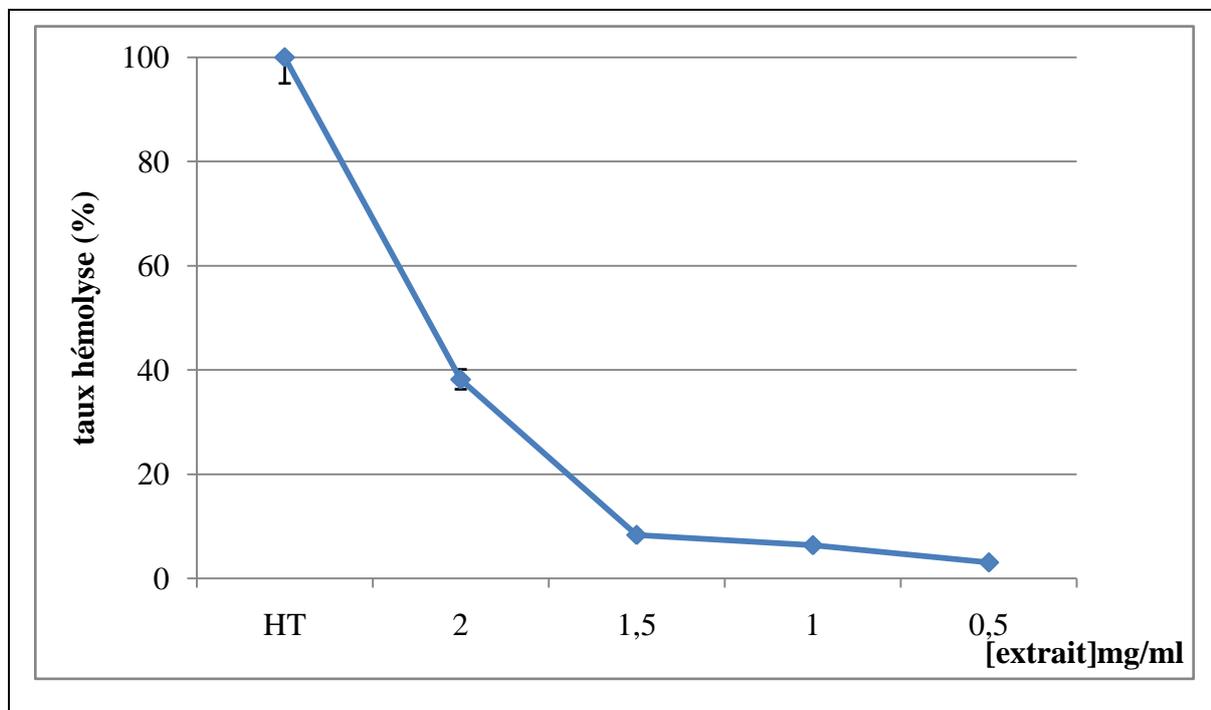


Figure 03 : Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *M. vulgare*, après 60 min d'incubation par rapport à l'hémolyse totale

D'après les résultats présentés dans la figure 04, nous avons noté des taux d'hémolyses très bas d'ordre de 3%, 6% et 8%, par rapport à l'hémolyse totale pour les concentrations 0,5 ; 1 et 1,5 mg/ml, respectivement. Ce taux est moyennement élevé (d'ordre de 38%) à une concentration de 2mg/ml d'extrait étudié, par rapport au témoin positif (hémolyse totale).

La découverte de nouvelles molécules d'origine végétale reste capitale pour leur utilisation comme de nouveaux remèdes thérapeutiques.

L'étude phytochimique qui consiste à détecter certains principes actifs existants dans la plante, permet de déterminer ses composés chimiques grâce à des techniques modernes, ces composés peuvent servir au développement de la phytothérapie.

En Algérie, les plantes médicinales n'ont jamais été totalement abandonnées et les gens n'ont jamais cessé de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui conduit à maintenir une tradition thérapeutique vivante malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne.

Des enquêtes ethnobotaniques récents effectuées dans le but de répertorier les plantes médicinales utilisées par la population dans l'Est et l'Ouest Algérien [**Azzi et al., 2012 ; Allali et al., 2008 ; Hamza, 2011**], soulignent l'importance qu'occupe ce patrimoine végétale dans la pharmacopée traditionnelle et surtout dans le traitement des différents maladies chroniques.

Le marrube blanc (*Marrubium vulgare*), famille des Lamiacées, est une plante herbacée vivace, spontanée très répandue dans la région méditerranéenne, utilisée traditionnellement comme plante médicinale pour traiter des différentes maladies. Sa partie aérienne est citée dans différentes enquêtes comme plante antidiabétique [**Ziyyat et al., 1997 ; Novaes, 2001 ; Azzi et al., 2014**].

Les tests phytochimiques, sur les différentes préparations de la partie aérienne, ont révélé la richesse de cette plante en tanins, coumarines et en composés réducteurs et la présence des alcaloïdes, des terpénoïdes, des stérols et des triterpènes

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature par les travaux de **Djahra, 2010**, qui confirme la présence des tanins et les travaux de **Azzi et al., 2014**, qui ont en plus des tanins, des alcaloïdes, les coumarines et des sucres réducteurs, ont révélé la présence des flavonoïdes et saponines.

De même, Les résultats des études phytochimiques effectuées par **Ashkennazy, 1983** sur le genre *Marrubium* ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les diterpènes et les triterpènes. Ils confirment aussi l'existence des tanins.

La toxicité d'une substance au niveau de l'organisme dépend de la nature de la substance, de la dose et de la durée d'exposition.

Les plantes sont aussi reconnues par leurs effets toxiques, ce qui nous à mener d'étudier l'effet hémolytique, *in vitro*, de cette plante

A souligner que *Marrubium vulgare* est une plante amère à caractère salin qui ne peut donc pas être toléré [**Aouadhi, 2010**].

Les globules rouges ont été choisis comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire pour l'étude de la cytotoxicité *in vitro* à cause de leurs facilités d'isolement et leurs simplicités. Ils sont un outil précieux pour l'étude des transports ioniques transmembranaire via la membrane érythrocytaire [**Wajeman et al., 1992**].

Les résultats de l'effet hémolytique d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *M. vulgare*, préparé par décoction, ont montré que cette plante présente un effet toxique très faible face aux érythrocytes isolés, avec un taux d'hémolyse qui ne dépasse pas les 8% à une concentration de 1,5mg/ml par rapport à l'hémolyse totale. Cet extrait peut être légèrement toxique sur les érythrocytes isolés à une concentration de 2 mg/ml avec un taux d'hémolyse enregistré d'ordre de 38%.

Ces résultats sont confirmés par l'étude de **Moussaoui et Harkati en 2013**, qui ont enregistré un taux d'hémolyse d'ordre de 5,4% , 45min après l'incubation de 0,2mg/ml d'extrait brut aqueux de *M. vulgare*, récolté de la région de Mansourah wilaya de Tlemcen, par rapport l'hémolyse totale.

Dans les mêmes conditions **Elalaoui (2014)** à enregistrer un taux d'hémolyse d'ordre 88% après l'incubation d'érythrocytes isolés dans le PBS (pH= 7,4) en présence de 1ml/ml d'extrait brut hydroalcoolique des grains de nigelle (*Nigilla sativa*).

A la lumière des résultats obtenus, nous avons conclu que la partie aérienne du marrube blanc *Marrubium vulgare*, récoltée dans la région de Fillaoucene wilaya de Tlemcen, est très riche en tanins, coumarines et composés réducteurs. Elle contient des alcaloïdes, des terpénoïdes, des stérols et des triterpènes.

D'après les tests biologiques, réalisés *in vitro*, sur des érythrocytes isolés du sang humain, incubés dans un milieu tampon PBS (pH 7,4), en présence des différentes concentrations d'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de cette plante, nous avons constaté que cette plante est très faiblement toxique. Elle peut être une source très importante dans les domaines thérapeutiques et pharmacologiques pour soulager les différentes maladies.

Ce travail reste préliminaire et pas indicatif sur le mécanisme réel par lequel agit cette plante sur les érythrocytes isolés du sang humain.

Par conséquent, la réalisation d'autres études complémentaires seraient nécessaires :

- ✓ Etude de la cytotoxicité, fuite cellulaire, par l'étude de la pompe Na^+/K^+ ,
- ✓ La réalisation d'une étude phytochimique approfondie qui consiste en: la purification, l'identification, caractérisation des composés actifs ;
- ✓ Etude de la toxicité aiguë et chronique, *in vivo*, sur un modèle animal, afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et de mieux identifier les sites d'action des substances actives.

- 1) **Aguilar-Martinez, 2007** : H2- Erythrocytes-MB7 : Hématologie H2 – Faculté de Médecine Montpellier- Nimes.
- 2) **Ahmad Faraj Atiyat, 1995**: plantes médicinales et aromatiques dans le monde arabe, l'agriculture et la fabrication de plantes médicinales dans le monde arabe. Institution arabe pour les études et publication, p: 2-22.
- 3) **Ajabnoor M.A.; Alyahya M.A.; Tariq M.; Jayyab A.A., 1984**: Antidiabetic activity of *Hamda salicorica*. *Fitoterapia* 40(2):107-109.
- 4) **Alain Damier, 2002** : Guide du traitement des déchets.3 édition. Dunod. Paris.
- 5) **Al kadi 1989** : A. Usage de quelques plantes dans la médecine populaire en Libie, Vol1-2.
- 6) **Allali H, Benmehdi H , Dib M A, Tabti B, Ghalem S and Benabadji N., 2008**: Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. *Asian J Chem*; 20 (04): 2701-2710.
- 7) **Aouadhi S., 2010**: mémoire Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle étude de 57 plantes recommandées par les herboristes.
- 8) **APG III, 2009**: An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.*; 161: 105-121.
- 9) **Azzi R., Djaziri R., Lahfa F., Sekkal F.Z., Benmehdi H., Belkacem N., 2012**: Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*; 6(10): 2041- 2050.11
- 10) **Azzi R., 2013** : Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar. Thèse doctorat en biochimie, département biologie, Faculté SNV STU, université Tlemcen(Algérie).

- 11) **Azzi R, Lahfa F and Djaziri R., 2014:** Phytochemical, antihyperglycemic and antihyperlipidemic study of crude hydroalcoholic extract of aerial parts of *Marrubium vulgare* L. in normal and streptozotocin induced-diabetic wistar rats. *Int J Pharm Sci Res* 2014; 5(5): 2006-13.
- 12) **Baba aissa F., 1999 :** Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algerie, Ed. Librairie moderne- Ruiba.p.46-47-194-195-231.
- 13) **Bellakhdar. J., 1997:** Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires, La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. Le Fennecet Ibio Press, impression : Dunes France. p 341.
- 14) **Bhat S.V.; Nagasampigi B.A. et Sivakumar M., 2005:** Chemistry of Natural Products; Ed 1: NAROSA, SPRINGER; p: 115-252.
- 15) **Bismuth C.; Baud F. ; Fréjaville P.P. ; Garnier R., 1987:** Toxicologie clinique. Flammarion Médecine Sciences, Paris, p 956.
- 16) **Bonnier G., 1990 :** La grande Flore française Ed.Bllin ; Complète. Tome : 09. 25-26.La Végétation de la France, Suisse et Belgique.
- 17) **Bonvalot N., 2002 :** Analyse des méthodes d'élaboration des valeurs toxicologiques de référence (VTR) : une aide à la sélection ? Méthode d'élaboration : 14. Département santé-environnement-travail et génie sanitaire (DSETGS), UMR 1085 Institut de recherche sur la santé l'environnement et le travail (IRSET)
- 18) **Bruneton J., 1999 :** pharmacognosie, 4^e ed. Lavoisier.
- 19) **Cseke L. J.; Kirakosyan A. et al., 2006:** Natural Products From Plants; Ed2: CRC Press; p: 22- 25.
- 20) **CSST (Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec), 2004 :** Notion de toxicologie. Bibliothèque nationale du Québec ; 2^e édition.
- 21) **Elalaoui (2014) :** contribution à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'effet hémolytique d'extrait brut hydroalcoolique des grains de *Nigella sativa* L. Université de Tlemcen.
- 22) **Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D., 2007 :** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

- 23) **Farnsworth N. R.; Akerele O.; Bingel A. S. ; Soejarto D. D. et Guo Z., 1986** : Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, **64** (2) : 159-164.
- 24) **Fouché j. g. ; Marquet A. et Hambuckers A., 2000** : les plantes médicinales de la plante au médicament .*observatoire du monde des plantes sart- tilman*.
- 25) **Guignard J.L.;Cosson L.et Henry H., 1995** : Abrégé de phytochimie ;Hasson. 224p.
- 26) **Guo-Xiang L. et Zai-Qun L., 2008** : The protective effects of ginsenosides on human erythrocytes against hemin-induced hemolysis. *Food and Chemical Toxicology* 46: 886–892.
- 27) **Gurib-Fakim A., 2006**: Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.
- 28) **Hamza N., 2011**. Effets préventif et curatif de trois plantes médicinales utilisées dans la Wilaya de Constantine pour le traitement du diabète de type 2 expérimental induit par le régime « high fat » chez la souris C57BL/6J. Thèse Doctorat en science alimentaire option : Nutrition. Univ. Mentouri Constantine, Institut de Nutrition de l'alimentation et des Technologies agroalimentaires : 32-61.
- 29) **Harbone J.B., 1998** : *Phytochemical Methods : A guide to moderne techniques of plant analysis* 3^e ed. :chapman and hill.1998. 303p.
- 30) **Judd W.S. ; Campbell C.S. ; Kellogg E.A. et Stevens P., 2002** : *Botanique Systématique: une perspective phylogénétique*; Ed 1: DEBOECK; p: 84-336.
- 31) **Khanbabae K and Ree T.R. 2001**. Tannins:Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry*. 18: 641-649.(cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- 32) **Laigneau Jaques, 2000** : Mort annoncée du pire des tests.
- 33) **Lapointe, G., 2004** : *Notions de Toxicologie*. Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec, Québec. 67 p.
- 34) **Laroche L.H., 2001** : *Toxicologie générale* : 25.
- 35) **Lhuillier A., 2007** : Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *agauria salicifolia hook.f ex oliver*, *agauria polyphylla baker*

- (ericaceae), tambourissa trichophylla baker (monimiaceae) et embelia concinna baker (myrsinaceae), Toulouse, France.
- 36) Madhavi D.L. et al; 1996;** Food antioxidants; Ed: CRC PRESS; p: 361- 460.
- 37) Makkar H.P.S.; Siddhuraju P. et Becker K., 2007:** Plant Secondary Metabolites, Methods in Molecular Biology 393; Ed: HUMANA PRESS; p: 67-111.
- 38) Marles R.J. et Farnsworth N., 1996 :** Antidiabetic plants and their active constituents:an update. Protocols Journal of Botany and Medicine 1, 85–135.
- 39) Mohan C., 2006:** Buffers. A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. EMD, San Diego, California, Calbiochem: 22.
- 40) Montgomery C.A., 1990:** Oncological and toxicological research: Alleviation and control of pain and distress in laboratory animals.
- 41) Moussaoui Soumia et Harkati Zeyneb, 2013 :** Contribution a l'étude phytochimique et l'effet hémolytique de trois plante utilisée pour le traitement du diabète contenant (*Eucalyptus globulus*, *Haloxylon scoparium* et *Marrubium vulgare*) DES biochimie, département biologie, Faculté SNV STU , université Tlemcen (Algérie).
- 42) Novaes A.P., Rossi C., Poffo C., Pretti E.J., Oliveira E.A. and Schlemper V. (2001).** Preliminary evaluation of effect of some Brazilian medicinal plants. Therapie, **56**:427–30.
- 43) Novak, I.; Buzas, G.; Minker, E.; Kolfai, M. et Szendrei, K. Planta med. 1966,** 14, p: 57.
- 44) Omar Abdul Razzaq et Mohamed El Sayed haykle, 1993:** plantes medicinales et aromatiques deuxième édition, installations connaissances d'Alexandrie, p: 13-134.
- 45) OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 2000 :** Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle; 1 : 1-79.
- 46) Ozenda P., 2004 :** Flore et végétation des Sahara. CNRS, Paris, pp. 399-402.
- 47) Paris M. et Hurabielle M., 1980 :** Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie), *Tome 1 Paris*.

- 48) **Quezel. F et Santa. S., 1963** : Nouvelle Flore de L'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Vol. 1-2, 801-802, Ed.CNRS, Paris France, 1962,1963.
- 49) **Raynaud J., 2007** : Prescription et conseil en phytothérapie. Tec & Doc, Paris, pp. 148–149.
- 50) **Rice-Evans C. A. et Packer L., 1998**: Flavonoids in Health and Disease; Ed: MARCEL DEKKER; p: 61- 160.
- 51) **Rolland A., 1988** : Etude pharmacologique et contribution à l'étude botanique et chimique d'Eschscholtzia californica, Doctorat de l'université de M et z, mention pharmacognosie, p 441.
- 52) **Ruckebusch Yves, 1981**: Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animales. 2^e Edit.
- 53) **Saad B. ; Azaizeh H. ; Abu-Hijleh G. ; Said O., 2006** : Safty of traditional Arab herbal medecine. Evidence- Based Complement. Alternat.Med.; 3(4) : 433-439.
- 54) **Schwartz D., 1992** : Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. 3eme edit. Paris ; Flammarion medecine-Sciences.
- 55) **Shubik P. et Sicé J., 1956**: Chemical carcinogenesis as a chronic toxicity test. Cancer Res., 16, 728.
- 56) **Silbergeld, E. K., 2000** : La Toxicologie : Introduction. In *Encyclopédie de Sécurité et de Santé au Travail*.Vol 1 (edited by J. M. Stellman). Organisation Internationale du Travail, Genève.pp 33.2-33.3.
- 57) **Smythies J.R., 1998**: Every Person.S Guide to Antioxidants; Ed: BRITISH CATALOGING; p: 89-110.
- 58) **Trease G.E., Evans W.C., 1989**: A textbook of Pharmacognosy (13th edition) Bacilluere Tinal Ltd, London.
- 59) **Trevoux R.; Arnal-Schnebelen B. Schnebelen J., 2000** : Interaction médicamenteuses, Interaction entre les plantes médicinales et la midication traditionnelle. Actualités reproduction humaine ; VIII (1) : 28- 32.

- 60)Truhaut R., 1956 :** Les risques d'action cancérigènes des substances étrangères ajoutées en vue d'améliorer les qualités organoleptiques des aliments. Ann. Falsif. (Paris). 49, 107, 136.
- 61)Valnet J., 1983 :** Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes, Ed. Maloine S. A. Paris.
- 62)WAJEMAN H. LANTZ B., GIROT R., 1992.** - les maladies du globule rouge.- 2^e édition ; Paris : INSERM.
- 63)Walton N.J. et Brown D.E., 1999:** Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products; Ed: WORLD SCIENTIFIC; p: 1-14.
- 64)Ziyyat A. Legssyer A. Mekhfi H. Dassouli, Serhrouchni M. et Benjelloun W., 1997:** phytothérapie of hypertension and diabète in oriental Morocco. Journal of Ethnopharmacology; 58 : 45- 54.

Préparation des réactifs pour tests phytochimiques

Réactif de Mayer

- **Solution A :** 1,358 g de chlorure de mercure HgCl_2 sont dissous dans 60 ml d'eau distillé.
- **Solution B :** 5 g d'iode de potassium KI sont dissous dans 10 ml d'eau distillé ; Les solutions A et B sont mélangées extemporanément et le volume final est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

Réactif de Wagner

- 2 g de KI et 1,27 g de I sont dissous dans 75 ml d'eau distillée, puis ajusté à 100 ml avec l'eau distillé.

Liqueur de Fehling

- **Solution A :** solution de sulfate de cuivre à 40 g/l.
 - **Solution B :** 200 g de tartrate de potassium- sodium et 150 g de NaOH pour 1 litre d'eau distillé.
- Mélanger les deux solutions à volumes égaux (à mélanger juste avant l'emploi).

PBS :

Phosphate buffered saline PBS est une solution tampon très utilisé dans la recherche biologique moderne. Contient le chlorure sodium, sodium phosphate, la chlorure de potassium et le potassium phosphate.

Utilisé pour la maintenance de pH constant, l'osmolarité et les concentrations d'ions de solution toujours utilisé ceux d'être humain (milieu isotonique), le PBS a beaucoup des utilisations parce qu'il considère comme isotonique et non-toxique pour la cellule.

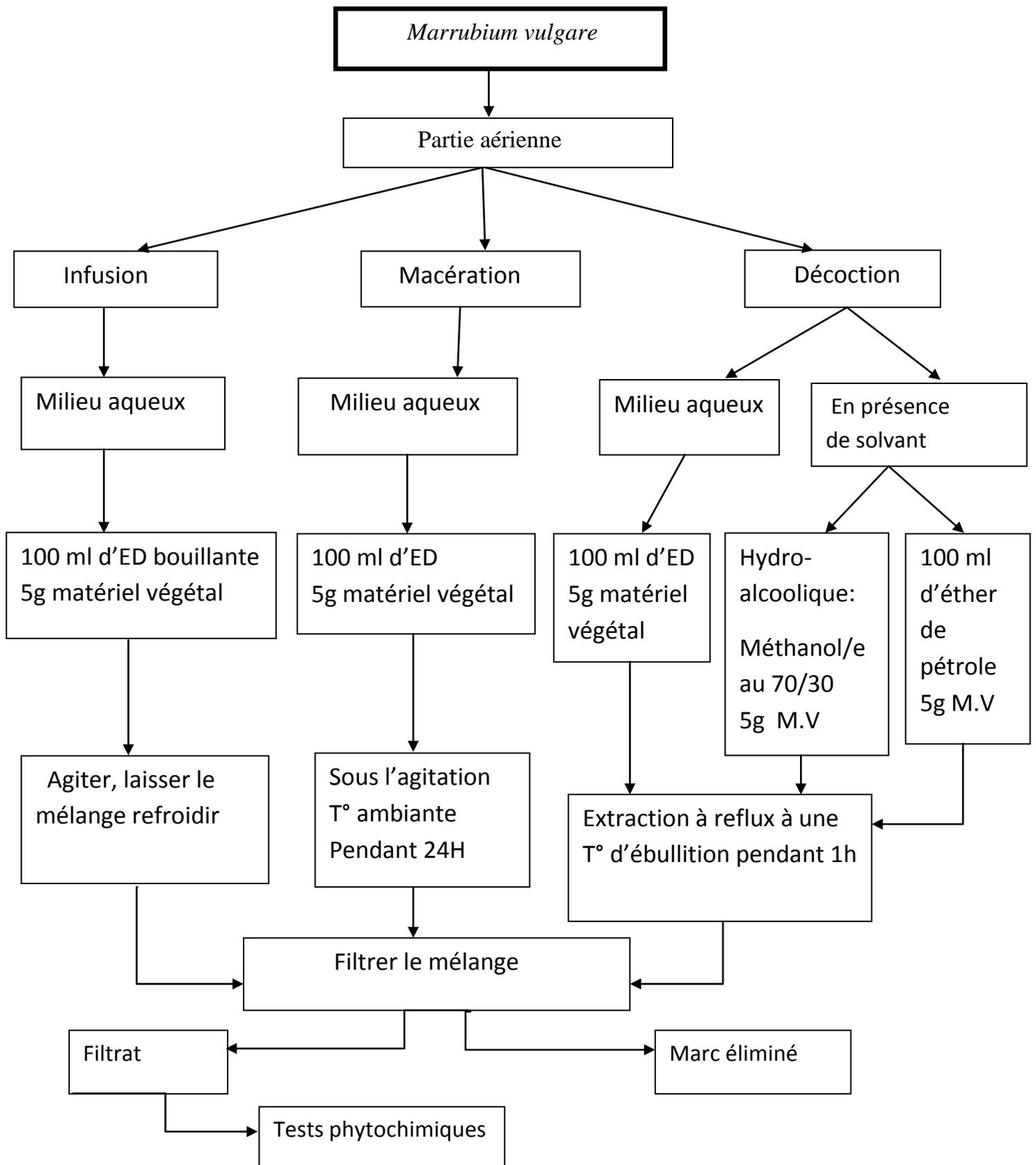


Figure 04: Diagramme montrant les différentes préparations des extraits

Tableau 02 : Les tests phytochimiques [Trease et Evans, 1989 ; Harborne, 1998].

Tests phytochimiques			
Les extraits à analyser	<i>Marrubium vulgare</i> (partie aérienne)		
	Infusion	Macération	Décoction
	En milieu aqueux		
Alcaloïdes	1 ml de chaque extrait dans un tube à essai		
	5 gouttes de réactif de Mayer	5 gouttes de réactif de Wagner	
	Résultat	Précipité blanc	Précipité brun
Tanins	5 ml de chaque extrait dans un tube à essai		
	1 ml de la solution aqueuse de FeCl ₃ à 1%		
	Résultat	Coloration verdâtre ou bleu noirâtre	
Flavonoïdes	5 ml de chaque extrait dans un tube à essai		
	Quelques copeaux de magnésium		
	Résultat	Coloration rose ou rouge	

Saponines	2ml d'extrait préparé par décoction dans des tubes à essai		
	<u>Ajuster</u> le volume de chaque tube à 2ml avec l'eau distillé		
	<u>Agiter</u> chaque tube horizontalement pendant 15s raison de 2 agitation /seconde		
	<u>Laisser</u> reposer 15minutes		
	Résultat	Développement ou non de la mousse	
Coumarines	1ml de chaque extrait dans un tube à essai		
	0,5ml de NH ₄ OH à 25% mélanger et observer sous UV à 366nm		
	Résultat	Fluorescence intense	

Stérols et triterpènes (Lieberman Burchard)	5ml de chaque extrait dans un bécher		
	1ml d'anhydride acétique et 0,5ml d'acide sulfurique H ₂ SO ₄		
	Concentré, laissé reposer 20 min.		
	Résultat	Formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant	

Composées réducteurs	1ml de chaque extrait dans un tube à essai			
	1ml de liqueur de Fehling, incubé l'ensemble 8 min dans un bain marie bouillant.			
	Résultat	Précipité rouge brique		
Antraquinones libres : Réaction de Borntrager	Décoction	En présence de solvant éther de pétrole		
	5ml de chaque extrait dans des tubes à essai			
	2,5ml de NH ₄ OH à 20% ; agitation			
	Résultat	Coloration plus ou moins rouge		
Terpénoïdes	En milieu aqueux			
	2,5ml de chaque extrait dans des tubes à essai			
	0,4ml de chloroforme et 0,6ml d'acide sulfurique concentré			
	Résultat	La formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase		

Tableau 03: L'évolution de l'absorbance des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extraits brut hydroalcoolique de *M. vulgare* à 37°C durant 1 heure à 548nm.

	0	15	30	60
HT	1,4023	1,448	1,458	1,4659
PBS+ susp	0,0179	0,0234	0,027	0,0367
50µg/ml	0,0425	0,05507	0,0673	0,0816
100µg/ml	0,068	0,0764	0,0958	0,13
150µg/ml	0,0694	0,0705	0,0805	0,1585
200µg/ml	0,0783	0,1457	0,2557	0,5964

Tableau 04 : L'évolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations d'extraits brut hydroalcoolique de *M. vulgare* après 1 heure d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

oncentration	0,5mg/ml	1mg/ml	1,5mg/ml	2mg/ml
Taux d'hémolyse %	3,06	6,34	8,35	38,13