



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Aboubakr Belkaid – Tlemcen –

Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie



Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement
« LAMAABE »

MEMOIRE

Présenté par

Belmir Ikram

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master en Science Biologiques

Option : Microbiologie fondamentale

Thème

**Evaluation de l'activité antibactérienne de *Marrubium vulgare* de
la région de Tlemcen**

Soutenu, le 22/ 06/2025, devant le jury composé de :

Président	Mr Belyagoubi Larbi	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	Mme Ayad Amel	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme Mesli Esmâ	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2024 /2025



Remerciements

*Tout d'abord, je tiens à remercier **Dieu** le tout puissant pour m'avoir donné la force, la patience et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*Je tiens particulièrement à remercier ma promiseuse de mémoire, **Madame Ayad Amel**,*


Maitre de conférences de département de biologie à l'université de Tlemcen pour sa disponibilité, de m'avoir dirigée et soutenu au cours de la réalisation de ce travail. Elle trouve aussi l'expression de ma profonde gratitude pour ces précieux conseils et ses encouragements.

*Mes remerciements s'adressent également à **Mr Belyagoubi Larbi** qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury, **Mme Mesli Esma** d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **Mr Habi Salim** pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son laboratoire et pour son accompagnement précieux lors de la réalisation d'une partie de la partie pratique de ce travail. Sa disponibilité et ses conseils ont grandement contribué à l'avancement de ma recherche.*

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à l'ensemble des enseignants de ma formation à la faculté pour la qualité de leur encadrement, leur précieuses conseils et leur disponibilité tout au long de mon parcours.

*Mes remerciements, s'adressent également à l'ingénieur du laboratoire « **LAMAABE** » pour sa patience et son professionnalisme, qui ont grandement contribué au bon déroulement de mon travail pratique.*



Dédicaces

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,

A ma chère mère

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien-être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous portez depuis mon enfance, et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours, que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A la mémoire de mon père

Ce travail est dédié à mon père, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études, j'espère que le monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

A mes sœurs et mon seul frère

Je dédie ce travail à mes chères sœurs et mon cher frère pour leur dévouement, leur compréhension et leur grande tendresse, qui en plus de m'avoir encouragée tout le long de mes études, pour leur soutien, leur conseil et leur amour.

Merci d'avoir toujours soutenu et merci pour tous les bons moments passé ensemble, et ce n'est pas fini.

A mes amis

Ahlem, Manel, Achwak, Fatima et Chaimaa, je vous dédie ces quelques lignes en signe de reconnaissance pour votre soutien indéfectible et votre aide précieuse tout au long de période de pratique. Puisse votre chemin être toujours illuminé de réussite, tant sur le plan personnel que professionnel.



ملخص

في مواجهة الظهور المتزايد للمقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية، تتجه الأبحاث بشكل متزايد إلى البدائل الطبيعية. في هذا السياق، تهدف دراستنا إلى تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات المائية والعضوية لنبات المريوة على السلالات المرجعية والسلالات السريرية متعددة المقاومة للمضادات الحيوية،

تم تعريض أوراق النبات للنقع، قبل وبعد إزالة الشحوم للحصول على المستخلصات الخام (القطبية والقطبية المعتدلة والقطبية غير القطبية). تم تقييم النشاط المضاد للجراثيم باستخدام طريقتين: الانتشار القرصي على وسط آجار (بتركيزات 10 و20 أظهرت النتائج نشاطاً كبيراً للمستخلصات القطبية ضد البكتيريا (MIC) و50 ملجم/مل) وتحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط والمكورات ATCC 29213 موجبة الجرام. ولوحظت مناطق تثبيط من 7 إلى 13 ملم ضد المكورات العنقودية الذهبية و7 إلى 12 ملم ضد السلالة السريرية للمكورات العنقودية الذهبية. ATCC 12493 العنقودية الذهبية العنقودية الذهبية مع (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) وبالإضافة إلى ذلك، لوحظ نشاط معتدل ضد سلالة سالبة الجرام *S. aureus* ATCC 29213 مناطق تثبيط تتراوح بين 7 إلى 10 ملم. وتراوح تركيز التركيز الفعال المثبط ضد بكتيريا بين 50 و100 ملجم/مل. تشير هذه النتائج إلى أن الماروبوس الأبيض له إمكانات علاجية MRSA ATCC12493 واعدة كعامل طبيعي مضاد للبكتيريا، خاصةً ضد البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة.

الكلمات المفتاحية: المريوة، نشاط مضاد للبكتيريا، بكتيريا متعددة المقاومة، مستخلص مائي، مستخلصات عضوية

Abstract

Faced with the growing emergence of bacterial resistance to antibiotics, research is increasingly turning to natural alternatives. In this context, our study aims to evaluate the antibacterial activity of aqueous and organic extracts of *Marrubium vulgare* on reference and clinical strains with multiple antibiotic resistance.

Plant leaves were subjected to maceration, before and after delipidation, to obtain crude extracts (polar, moderately polar and apolar). Antibacterial activity was assessed using two methods : disk diffusion on agar medium (with concentrations of 10, 20 and 50mg /ml) and minimum inhibitory concentration (MIC) determination. The results reveal a notable activity of polar extracts against Gram-positive bacteria. Zones of inhibition of 7 to 13 mm were observed against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and MRSA ATCC 12493, and 7 to 12 mm against the clinical strain of *Sstaphylococcus aureus*. In addition, moderate activity was noted against a Gram-negative strain (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) with zones of inhibition of 7 to 10 mm. The MIC for *S. aureus* ATCC 29213 and MRSA ATCC12493 ranged from 50 to 100mg/ml. These results suggest that white marrubus has promising therapeutic potential as a natural antibacterial agent, particularly against multidrug-resistant bacteria.

Key words : Marrubium vulgare, Antibacterial activity, Multi-resistant bacteria, Aqueous extract, Organic extracts

Résumé

Face à l'émergence croissante de la résistance bactérienne aux antibiotiques, la recherche se tourne de plus en plus vers des alternatives naturelles. Dans ce contexte, notre étude a pour objectif d'évaluer l'activité antibactérienne d'extrait aqueux et les extraits organiques de *Marrubium vulgare* sur des souches de référence et des souches cliniques multirésistantes aux antibiotiques

Les feuilles de la plante ont été soumises à une macération, avant et après délipidation, afin d'obtenir des extraits bruts (polaire, moyennement polaire et apolaire). L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée à l'aide de deux méthodes : la diffusion de disque sur milieu gélosé (avec des concentrations de 10, 20 et 50mg/ml) et la détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI). Les résultats révèlent une activité notable des extraits polaires contre les bactéries à Gram positif. Des zones d'inhibition de 7 à 13 mm ont été observées contre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *SARM* ATCC 12493 et de 7 à 12 mm contre la souche clinique de *Sstaphylococcus aureus*. De plus une, une activité modérée a été noté contre une souche à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) avec des zones d'inhibition de 7 à 10 mm. La CMI pour *S. aureus* ATCC 29213 et *SARM* ATCC12493 est comprise entre 50 et 100mg/ml. Ces résultats suggèrent que le marrube blanc présente un potentiel thérapeutique prometteur en tant qu'agent antibactérien naturel, en particulier contre les bactéries multirésistantes à Gram positif.

Mots clés : *Marrubium vulgare*, Activité antibactérienne, Bactéries multirésistantes, extrait aqueux, extraits organiques

Table des matières

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des abréviations.....	III
INTRODUCTION	01
Synthèse bibliographique	
CHAPITRE 1: Etude phytochimique de plante	5
1.1 Famille des lamiacées	5
1.1.1 Généralités.....	5
1.1.2 Intérêt économique.....	5
1.2 Espèce de Marrubium vulgare.....	7
1.2.1 Description.....	7
1.2.2 classification.....	7
1.2.3 Nomenclature	8
1.2.4 Localisation et répartition	8
1.2.5 Utilisation traditionnelle	8
1.2.6 Composition chimique	9
1.2.7 Activités biologiques de Marrubium vulgare.....	15
1.2.8 Contre-indications et effets indésirables.....	16
Chapitre 2 : les bactéries multirésistantes	18
2.1 Définition de résistance bactérienne aux antibiotiques	18
2.1.1 Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	18
2.1.1.1 Inactivation enzymatique de l'antibiotique.....	18
2.1.1.2 modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique.....	18
2.1.1.3 la diminution de la perméabilité cellulaire	19
2.1.1.4 Pompe d'efflux.....	19
2.2 les bactéries multirésistantes (BMR)	19
Matériels et méthodes	
1. lieu d'étude	25
2. Matériel	25
2.1 matériel biologique	25
2.1.1 matériel végétale	25
2.1.2 souches bactériennes	25

2.1.3 Milieux de culture.....	26
2.1.3.1 Milieux de culture liquides	26
2.1.3.2 Milieux de culture solide	26
2.2 antibiotiques.....	26
2.3 Solvants chimiques.....	27
1.3.1 Solvants polaires	27
2.3.2 solvants moyennement polaires	27
2.3.3 solvants apolaires	27
Méthodes	27
3.1 préparations des souches bactériennes	27
3.2 préparation de matériel végétale	27
3.2.1 Délipidation	28
3.2.2 Macération	29
3.2.2.1 Macération sans délipidation.....	29
3.2.2.2 Macération après délipidation	29
3.2.3 Filtration des extraits	30
3.2.4 Evaporation	30
3.2.5 Récurépatron de l'extrait sec	31
3.2.6 calcul de rendement	31
3.3 Evaluation de l'activité antibactérienne	31
3.3.1 Méthode de diffusion de disque sur milieu solide	31
3.3.2 détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI.....	32
1. Souches bactérienne étudiées	35
2. aspect des extrait obtenus.....	35
3. Rendement.....	36
4. Activité antibactérienne	38
Résultats et discussion	
4.1 Résultat de méthode de diffusion de disque	38
4.1.1 activité antibactérienne des extraits de la plante sans délipidation	38
4.1.2 activité antibactérienne des extraits après délipidation de la plante	40
4.2 Les résultats de CMI	42
Conclusion	48
Références bibliographiques.....	51
Annexes.....	59

Listes des figures

Figure 01 : Marrubium vulgare.....	07
Figure 02 : Quelques diterpènes isolés de M. Vulgare	09
Figure 03 : Structure chimique des flavonoïdes	09
Figure 04 : Structure de quelques flavonoïdes isolés de <i>M. vulgare</i>	10
Figure 05 : Acide Hydroxybenzoïque	11
Figure 06 : Acide hydroxycinnamique	11
Figure 07 : Structure chimique des tanins hydrolysables	12
Figure 8 : La structure d'un tanin condensé polymérique	12
Figure 09 : Structure chimique des saponines.....	13
Figure 10 : des entérobactéries observées au microscopie électronique	20
Figure 11 : <i>Acinetobacter baumannii</i> observé au microscopie électronique Grossissement 10000x 21	
Figure 12 : SARM observé au microscope électronique grossissement x2000	22
Figure 13 : <i>Enterococcus faecalis</i> observé au microscope électronique grossissement 10000x ..	23
Figure 14 : Préparation de matériel végétale	28
Figure 15 : Processus de délipidation par soxhlet	28
Figure 16 : Les étapes de macération	29
Figure 17 : L'étape de filtration	30
Figure 18 : les étapes de l'évaporation	30
Figure 19 : les extraits secs de <i>Marrubium vulgare</i>	31
Figure 20 : Appareil de MacFarland	32
Figure 21 : Aspects des souches étudiés sur leurs milieux sélectifs	35
Figure 22 : Le rendement des extraits de <i>Marrubium vulgare</i> avant et après délipidation.....	37
Figure 23 : Zones d'inhibition des différents extraits de <i>Marrubium vulgare</i> sans délipidation contre des souches pathogènes	40
Figure 24 : Zones d'inhibition des extraits (aqueux, éthanolique, méthanolique) de <i>Marrubium</i> <i>vulgare</i> après délipidation contre les souches de référence	42
Figure 25 : Zones d'inhibition des différents extraits de <i>Marrubium vulgare</i> avec délipidation contre <i>Staphylococcus aureus</i> pathogène	42
Figure 26 : CMI des extraits polaires testés sans délipidation contre les souches de référence..	44
Figure 27 : CMI des extraits polaires après dilipidation contre les souches de référence.....	44
Figure 28 : CMI d'extrait aqueux contre <i>Staphylococcus aureus</i> clinique	44

Listes des Tableaux

Tableau 01 : Ingrédients issus des Lamiacées pour des applications industrielles pionnières	06
Tableau 02 : Effets biologiques des biomolécules de <i>Marrubium vulgare</i>	14
Tableau03 : Dépistage phytochimique des extraits de <i>Marrubium vulgare</i>	15
Tableau 04 : Référence et origine des souches de référence testées	25
Tableau05 : Référence et origine des souches pathogènes testées	26
Tableau 06 : La couleur et l'aspect des extraits de <i>Marrubium vulgare</i>	36
Tableau 07 : Résultat de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé contre les souches de référence.	38
Tableau 08 : Résultat de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé contre les souches pathogènes.....	39
Tableau 09 : Résultat de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé des extrais testés.....	41
Tableau 10 : Résultat de CMI des 03 extraits testés contre les souches de référence	20

Liste des abréviations

ATP	Adénosine Triphosphate
BEA	Bile-esculine agar
BHIB	Milieu cœur-cervelle
BLSE	bêta lactamase à spectre étendu
BMR	Bactéries multi-résistantes
CDS	Centre pour le contrôle et la prévention des maladies
CMI	Concentration minimale inhibitrice
EAQ	Extrait aqueux
EBuOH	Extrait a n-butanol
EDcM	Extrait a dichlorométhane
EEP	Extrait éthanolique
EMeOH	Extrait méthanolique
MDR	Multi-Drug Resistant
OMS	Organisation mondiale de santé
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante a la méticilline
UFC	Unité Formant colonie
UMC	Service des urgences médicales et chirurgicales
WOAH	World organisation for animals

Introduction

Introduction

La résistance bactérienne aux antibiotiques constitue aujourd'hui un véritable défi pour la santé publique à l'échelle mondiale. Au cours des dernières décennies, le risque de contracter des maladies infectieuses a considérablement augmenté en raison de l'émergence et de la propagation des bactéries multirésistantes. Le monde entier est ainsi confronté à cette problématique, ce qui a fortement stimulé la recherche de nouveaux principes actifs antibactériens (**Zahir et al., 2018**).

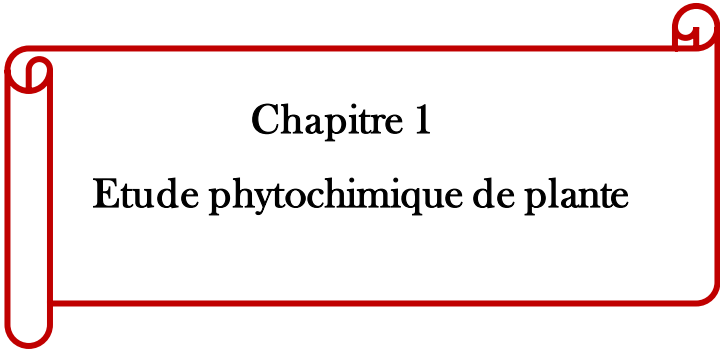
Les plantes, ainsi que les produits dérivés de celles-ci, jouent un rôle essentiel dans le soulagement et la guérison de nombreuses affections. Leurs composés complexes sont une source précieuse de substances biologiquement actives et d'autres phytochimiques, qui trouvent des applications variées dans les secteurs pharmaceutique, alimentaire et cosmétique (**Hrobonôvâ et al., 2021**). Parmi les plantes présentant des activités antimicrobiennes prometteuses, celles appartenant à la famille des Lamiacées occupent une place importante (**Waller et al., 2017**).

Dans le cadre de notre étude, notre choix s'est porté sur le marrube blanc ou *Marrubium vulgare*, une plante particulièrement riche en tanins et flavonoïdes, principalement présents dans ses feuilles. Très répandue dans le bassin méditerranéen, notamment en Algérie, elle est largement utilisée pour ses vertus thérapeutiques. En médecine traditionnelle elle est utilisée pour traiter le diabète, les infections des voies respiratoires et les troubles liés à la sécrétion biliaire.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail est d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits aqueux et organiques de la plante *Marrubium vulgare* contre des souches sauvages et des souches multirésistantes isolés des services de soins intensifs au CHU de Tlemcen.

Ce mémoire est divisé en trois parties. La première partie consiste en une recherche bibliographique, elle-même répartie en deux chapitres. Le premier chapitre aborde les généralités sur *Marrubium vulgare* (répartition, composition chimiques, utilisation, toxicité activités biologiques...), tandis que le second chapitre traite de la résistance bactérienne aux antibiotiques, ainsi que des bactéries multirésistantes. La deuxième partie consacrée pour la présentation des principales méthodes utilisés. Enfin la troisième partie traite de l'analyse des résultats obtenus, en mettent l'accent sur leur présentation, leur interprétation et leur discussion.

Synthèse bibliographique

A decorative red border with scroll-like corners, enclosing the chapter title.

Chapitre 1
Etude phytochimique de plante

1.1 Famille des Lamiacées

1.1.1 Généralités

La famille des Lamiacées est une famille des plantes médicinales très importante, appartient à l'ordre des Lamiales, cette famille a été connue depuis longtemps comme Labiatae ou famille de menthe (**Napoli et al., 2020**), cette appellation provient de fait que ses fleurs ont généralement des pétales fusionnés en une lèvre supérieure et une lèvre inférieure ; En 1980 le nom a été complètement changé en Lamiaceae. Cette dernière comprend environ 250 genres et plus de 7000 espèces répartissent en sept sous-familles : Ajugoideae, Lamioideae, Nepetoideae, Prostantheroideae, Scutellarioideae, Symphorematoideae et Viticoideae (**Napoli et al., 2020 ; Rajaa, 2012**).

La famille des labiées sont des plantes très aromatiques connus par ses capacités de production des huiles essentielles, incluent un grand nombre des herbes comme le thym, le romarin, et la lavande, des arbustes et quelque arbre. Elle se caractérise par une racine pivotante, une tige herbacée à section carrée et velue, des feuilles simples opposées et décussées et exstipulées, Les fleurs sont bisexuées, irrégulières, et hypogyne. Les plantes de cette famille ont un calyx gamosépales à cinq sépales ; bilabiés, un gynécée possède deux carpelles, syncarpique avec un ovaire supère. L'androcée est postérieur souvent réduites, possède quatre étamines (**Rajaa, 2012**).

1.1.2 Intérêt économique

La famille des Lamiacées comprend de nombreuses espèces ayant une valeur économique significative, que ce soit pour leurs huiles essentielles ou leur utilisation (Tableau 1), comme condiments. Parmi elles, on retrouve les genres *Mentha* (Menthe), *Lavandula* (lavande), *Marrubium* (marrube), *Nepeta* (herbe aux chats), *Ocimum* (basilic), *Origanum* (origan), *Rosmarinus* (romarin) et *Salvia* (sauge).

D'autres genres, comme *Saturga* (sarriette) et *Thymus* (thym), sont également exploités. Certaines espèces de *Stachys* produisent des tubercules comestibles, tandis que *Tectona* (teck) est une source précieuse de bois d'œuvre. De nombreuses espèces ornementales appartiennent également à cette famille, notamment celles des genres *Ajuja*, *Callicarpa*, *Clerodendrum*, *Monarda*, *Salvia*, *Scutellaire* et *Vitex* (**Judd et al., 2002**).

Un grand nombre de genres appartenant à la famille des Lamiacées constituent d'importantes sources de terpénoïdes, flavonoïdes, et iridoïdes glycosylés. Le genre *Phlomis*, qui regroupe près de 100 espèces, est particulièrement riche en flavonoïdes, phénylpropanoïdes et iridoïdes glycosylés. Le genre *Salvia*, comprenant environ 900 espèces, se distingue par sa forte teneur en diterpénoïdes. Quant au genre *Marrubium*, il compte environ 30 espèces réparties dans de nombreux pays à travers le monde (Bonnier, 1909).

Tableau 01 : Ingrédients issus des Lamiacées pour des applications industrielles pionnières (Trivellini et al, 2016).

Secteur industriel	Espèce/extrait/composés	Activité/propriété/effet	Produit cible
Cosmétique	<ul style="list-style-type: none"> - Acide coumarinique - Espèces de <i>Rosmarinus</i> - <i>Lavandula angustifolia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Induction de la mélanogénèse Photoprotecteur : UV-A élevé et capacité d'adsorption UV-B - Anti-staphylococcus aureus et activité anti-inflammatoire - Activités anti-collagénase 	<ul style="list-style-type: none"> - Protection solaire - Agent anti-acnéique pour la peau - Vieillessement de la peau
Alimentation	<ul style="list-style-type: none"> <i>Ajugaïva</i> ; <i>Marrubium vulgare</i> ; <i>Mentha Pulegium</i> - <i>Micromeria myrtifolia</i> : Thymol et carvacrol - <i>Thymus</i> spp. <i>Rosmarinus</i> spp. Et <i>Origanum</i> spp 	<ul style="list-style-type: none"> Antimicrobien - Antioxydant/ stabilisation contre la dégradation thermo-oxydative - Propriétés Antibactériennes 	<ul style="list-style-type: none"> - Conservateurs alimentaires - Additifs alimentaires/ Films actifs pour l'emballage - Conservateurs alimentaires dans les produits fitch et méat
Pesticide	<ul style="list-style-type: none"> - Thymol et eugénol - Thymol dans l'huile essentielle de <i>T. Vulgaris</i> - Carvacrol et thymol dans l'huile d'origan 	<ul style="list-style-type: none"> - Fongicide contre <i>Fusarium</i>, <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> - Activité anti-alphatoxigène - Activité nématocide 	<ul style="list-style-type: none"> - Fongicide - Nématocide

1.2 Espèce de *Marrubium vulgare*

1.2.1 Description

Marrubium vulgare L. est une herbe vivace a une hauteur varie de 25 à 45 cm, avec des feuilles veinées (souvent vert grisâtre) qui mesurent de 2 à 5 cm de long et ont une surface très dense recouverte de poiles duveteux (figure 1), elle possède des extrémités émoussées et arrondies, avec des grappes sphériques de petites fleurs blanches à deux lèvres à chaque nœud. Les tiges sont quadrangulaires densément pileuse, et très serres (figure 1). Ces tiges contiennent des branches et en base ligneuse (Bikarma, 2020 ; Van wyk et Wink, 2018). Cette plante possède des fleurs blanches de 6 à10 mm de longueur regroupés en verticilles aux nœuds supérieurs. Les fruits sont des akènes avec des épines crochus, et chaque fruit contient quatre nucules ovale, brun à noir, de 1 à2 mm de longueur. Marrube blanc a une forte odeur, aromatique et légèrement musquée, avec une saveur amère, nauséuse et un peut acre. La fluorisation de cette plante est dans la période ente juin et octobre (Ewald, 2017).



Figure 01 : : *Marrubium vulgare* (Polese, 2007)

1.2.2 Classification

Selon Judd et *al.*, (2002) la position systématique de l'espèce *Marrubium vulgare* est :

Règne	Végétale
Embranchement	Angiosperme
Classe	Eudicotylédones
Sous-classe	Gamopétale
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Marrubium.</i>
Espèce	<i>Marrubium vulgare</i> L.

1.2.3 Nomenclature

Le nom latin *Marrubium vulgare* divise en deux mots *Marrubium*, qui dérive du mot « *hébeu marrob* » qui signifie « jus amer », et *vulgare* qui signifie « commun ».

En anglais elle s'appelle *horehound* qui signifie « plante duveteuse ». En Serbe, elle est connue sous le nom de *ocajnica*, qui signifie « femme désespérée » en raison de l'utilisation de thé de cette plante pour la régulation du cycle menstruel chez les femmes (A'cimovi *et al.*, 2020). Dans les pays de Maghreb, elle est connue sous le nom de « Marrioua » en Algérie, « Marrubia » en Tunisie, « Merriwt » en Maroc (Menalala *et al.*, 2021).

1.2.4 Localisation et répartition

Marrube blanc, originaire de la région méditerranéenne et d'Asie centrale (A'cimović *et al.*, 2020) Cette plante se développe largement en Afrique du Nord et couvre presque toute l'Europe, on l'a trouvée également dans certaines régions d'Asie centrale et du sud-ouest, ainsi qu'aux Canaries. Par ailleurs, elle s'est acclimatée en Amérique de Nord et de Sud (Bonnier, 1909). Elle pousse en bordure des sentiers, au pied des murs et à proximité des habitations. On la trouve également dans les décombres, les terrains laissés à l'abandon et les zones incultes, avec une préférence marquée pour les sols calcaires. Son apparence rappelle fortement celle de la grande ortie (Lorrain, 2019).

1.2.5 Utilisation traditionnelle

Cette plante est couramment consommée sous forme de thé ou d'infusion en raison de ses propriétés stimulantes et antispasmodiques (A'cimović *et al.*, 2020). Elle est également utilisée pour traiter le diabète, les maux de tête et les douleurs de la vessie ou de l'utérus.

En outre, elle possède des vertus diurétiques, expectorantes, digestives et anti-inflammatoires. Selon la Commission allemande (Commission européenne), le marrube est utilisé dans le traitement des dyspepsies et la perte d'appétit (Djahra *et al.*, 2013).

Récemment, des études sur huile essentielle montre que cette dernière et leur composant montre une activité antibactérienne, antifongique et antioxydant (Zarai *et al.*, 2011).

En médecine traditionnelle tunisienne, *Marsupium vulgare* était utilisé comme hypotenseur, hypoglycémiant et cardiotonique (Zarai *et al.*, 2011).

1.2.6 Composition chimique

Les propriétés curatives de *Marrubium vulgare* sont probablement liées à la présence de diverses substances chimiques réparties dans l'ensemble de la plante (Djahra, 2014).

- **Diterpènes labdaniques** : cette catégorie comprend plusieurs composés tels que la prémarrubiine, Marrubiine, le marrébunol (figure 2), le marrubiol, l'acide marrubique, le marrulibacétal A, la geshoidine et la déacétyl-forskoline, ou le Marrubiine c'est le principal composé bioactif de la plante qui possède une propriétés Antispasmodique, anti-inflammatoire, Cholérétique et anti-hypertensive (tableau 2) (Ghedadba, 2018).

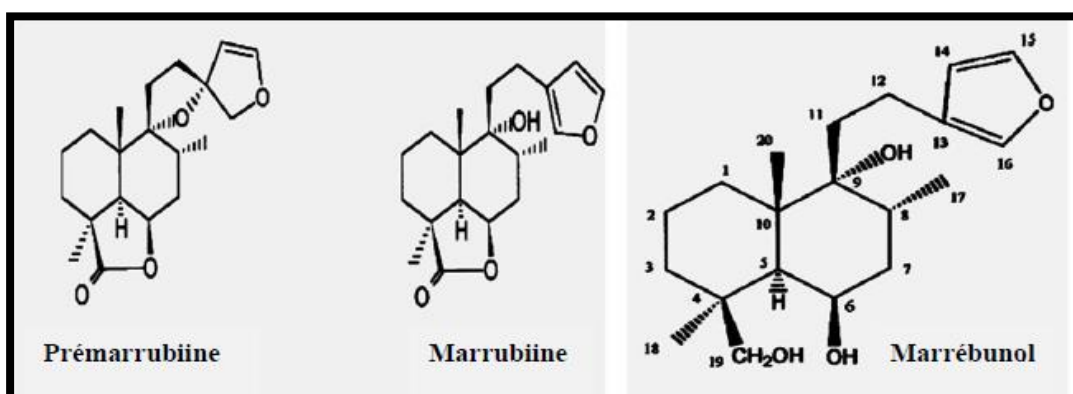


Figure 02 : Quelques diterpènes isolés de M. Vulgare

- **Flavonoïdes** : qui sont des composés possèdent un même squelette de base, la 2-Phényl chromons à quinze atomes de carbones, deux cycles en C6 (A et B), reliés par un Hétérocycle en C3 (figure 3), sont des dérivés de la benzo-y-pyrone constitués d'anneaux phénoliques et pyraniques (Kelly E et al., 2002), ces composants sont largement distribués chez les plantes supérieures, particulièrement dans certaines familles : Polygonacées, Rutacées, Légumineuses, Ombellifères. Ces dernières se répartissent en plusieurs classes dont les flavones, flavanols, flavanones, flavanols, anthocyanidines, chalcones et auronnes (Ghedadba, 2018).

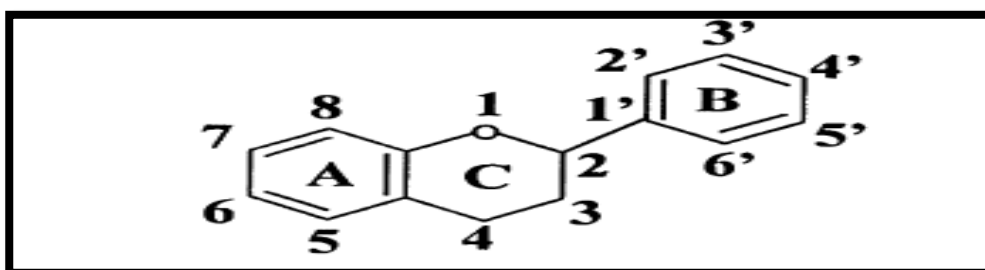


Figure 03 : Structure chimique des flavonoïdes

Dans *Marrubium vulgare*, les flavonoïdes sont isolés à partir des feuillettes par l'utilisation des solvants polaires, il se présentent généralement sous forme d'hétérosides flavoniques et flavonoliques, notamment ceux du quercétol, de la lutéoline et de l'apigénine. De plus, des lactoyflavones dérivées de l'acide ursolique (figure 4) (Nawwar *et al.*, 1989 ; Wolski *et al.*, 2007).

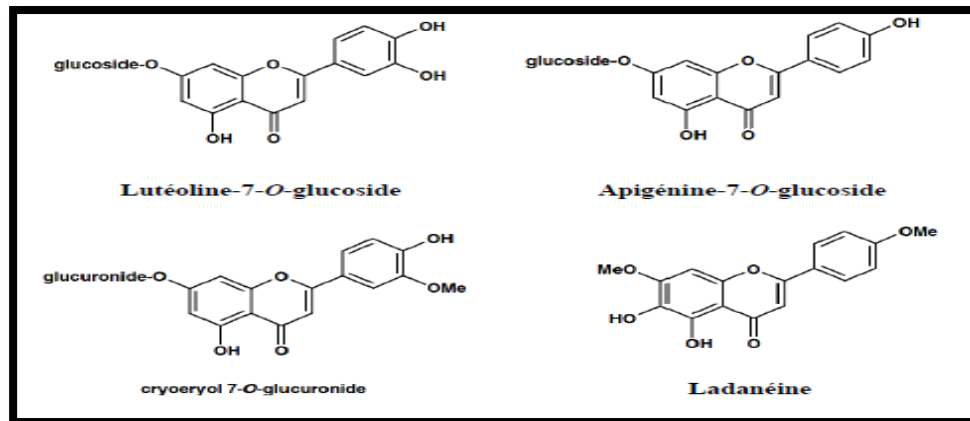


Figure04 : Structure de quelques flavonoïdes isolés de *M. vulgare*

- **Acides phénoliques**

Un acide phénolique ou acide-phénol est un composé organique qui possède au moins une fonction hydroxyle phénolique et une fonction carboxylique qui possède plusieurs propriétés ; antioxydants, anti-inflammatoire, antimicrobienne et anticancéreuse (tableau 2). On distingue deux catégories d'acides phénoliques : Les acides hydroxybenzoïques et les acides hydrodynamique.

- **Les acides hydroxybenzoïques** : Les acides hydroxybenzoïques ont une structure C₆-C₁ constituée d'un noyau benzénique auquel est reliée une chaîne aliphatique à un carbone (figure 5) (Chira *et al.*, 2008), parmi les on trouve l'acide caféique présent dans *Marrubium vulgare*.

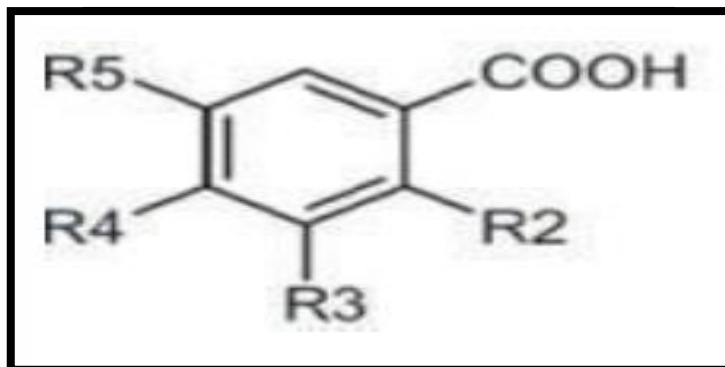


Figure05 : Acide Hydroxybenzoïque

- **Les acides hydroxycinnamiques** ; Ils possèdent un squelette principal basé sur le noyau benzénique, associé à une chaîne aliphatique comportant trois carbones (C6-C3) (figure 6), avec un ou plusieurs groupes hydroxyles (**Chira et al., 2008**).



Figure 06 : Acide hydroxycinnamique

- **Huile essentielle** : Présent en faible quantité en 0,05% (**Al-Snafi et al., 2021**) comportant différents constituants monoterpéniques (le limonène, la sabinène, l' α -pinène, le camphène et le para-cymène, Eugénol) (**Ghedabda, 2018**), cette classe des biomolécules possède une activité antioxydants, anticholinestérase et une activité antibactérienne (tableau 2).
 - **Tanins** : Les tanins sont des composés phénoliques naturels capables de précipiter les protéines à partir de leurs solutions aqueuses. Ils sont des métabolites secondaires présents dans toutes les parties des plantes supérieures, D'un point de vue chimique, ils se composent soit d'oses (généralement du glucose), soit de catéchine ou de triterpénoïde lié à des unités galloyles (ou leurs dérivés) ou encore d'oligomères ou polymères de flavanols, ces composés bioactifs ont montré un grand spectre d'activité antibactérienne ainsi qu'il possède une activité antioxydante (**Ghedabda, 2018**). Aujourd'hui, Les tanins sont répartis en deux catégories selon leur structure chimique, tanins hydrolysables et tanins condensés.
- **Tanins hydrolysables** : Il s'agit de polyesters d'oses et d'acides phénoliques. On retrouve principalement du glucose sous forme d'oses dans ces tanins. Deux catégories de tanins existent :
- * Les tanins galliques, qui se présentent sous la forme d'esters de glucose et d'acides galliques (figure 7).
 - * Les tanins ellagiques (figure 7), qui sont des esters d'oses et d'acide ellagique (**Ghedadba, 2018**).

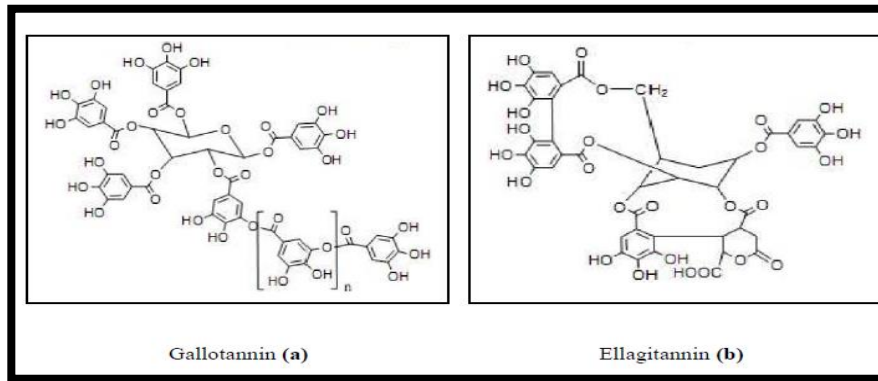


Figure 07 : Structure chimique des tanins hydrolysables (Ghedabda, 2018)

➤ **Tanins condensés** : Ils sont plus complexes mathématiquement et ne contiennent pas d'oses dans leur molécule (figure 8). Ils ne sont pas hydrolysés par les acides ni par les tannases. Cependant, lorsqu'ils apparaissent exposés à des acides forts ou à des agents d'oxydation, ils se métamorphosent en substances rouges appelées phlobaphènes.

Il s'agit de polymères de flavan-3-ols, également connus sous le nom de catéchines, et de flavan-3,4-diols appelés leuco-anthocyanidines, ou d'un mélange des deux.

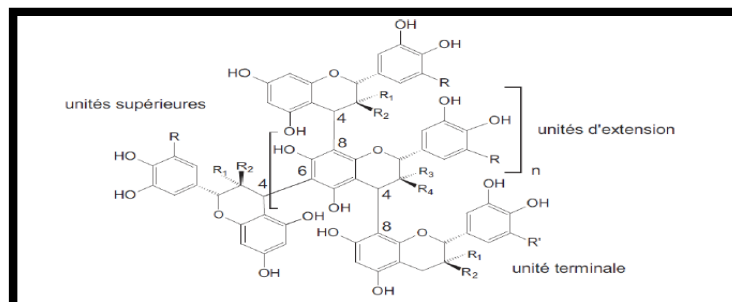


Figure 8 : La structure d'un tanin condensé polymérique (Ghedabda, 2018)

- **Saponines** : Sont constituent un groupe varié de composés largement présents dans le règne végétal. Elles se distinguent par une structure composée d'un aglycone de type triterpénique ou stéroïdien, lié à une ou plusieurs chaînes glucidiques (figure 9). L'intérêt croissant des consommateurs pour les produits naturels, en raison de leurs propriétés physico-chimiques (comme leur pouvoir tensioactif) et de leur activité biologique démontrée (notamment des effets anticancéreux et hypocholestérolémiants), a favorisé l'émergence des saponines comme molécules d'intérêt commercial. Ces composés trouvent des applications croissantes dans les industries alimentaires, cosmétique et pharmaceutique (Gûçlü-Üstündag et Mazza, 2007).

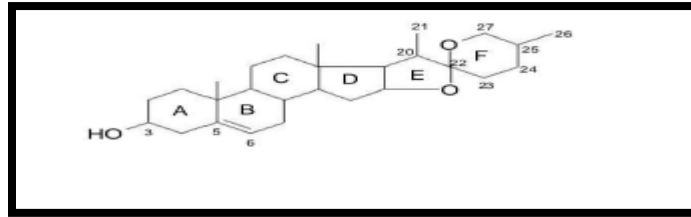


Figure 09 : Structure chimique des saponines (Voutquenne-Nazabadioko, 2010).

- **Alcaloïdes** : les alcaloïdes présentes une vaste famille de métabolismes secondaires azotés, produits principalement par les plantes. Ils se distinguent par la présence d'au moins un atome d'azote, généralement intégré dans un noyau hétérocyclique. De nature majoritairement basique et de faible poids moléculaire, ces composés présentent une grande variété de structures et d'effets biologiques. Ils sont largement étudiés pour leurs activités pharmacologiques et thérapeutique, et jouent également un rôle essentiel dans la défense des plantes contre les agressions biotiques, telles que les herbivores ou les microorganismes pathogènes (**Bruneton, 2016**).
- **Mucilage** : Le mucilage est sécrété comme une couche supplémentaire de la paroi cellulaire par l'appareil de Golgi. Sauf lorsqu'il est associé aux cristaux de raphide, le mucilage présent dans les vacuoles et peu fréquent chez les dicotylédones. Les cellules mucilagineuses situées dans les organes végétatifs remplissent plusieurs fonctions : elles participent au stockage des glucides et de l'eau, réduisent la transpiration, et protègent la plante contre les rayonnements lumineux intenses en les diffusant ou les réfléchissant. De plus, elles jouent un rôle dans la défense contre les herbivores (**Grégoire et Baas, 2013**).

Tableau 2 : Effets biologiques des biomolécules de *Marrubium vulgare* (Ghedadba, 2018)

Biomolécules	Fonctions	Références
Diterpènes-labdanes (marrubiine, marrubénol)	Antispasmodique, anti-inflammatoire Cholérétique, anti- hypertensive	(El-Bardai <i>et al.</i> , 2004 ; Stulzer <i>et al.</i> , 2006 ; Yousefi <i>et al.</i> , 2014).
Acides phénoliques, phénylétanoïdes (marruboside)	Antioxydants, anti- inflammatoire, Antimicrobienne,	(Berrougui <i>et al.</i> , 2006 ; Ahmed <i>et al.</i> , 2008 ; Xue et yang, 2016).
Flavonoïdes	Antioxydants, anti- inflammatoire, Analgésique, antidiabétique, antibactérienne	(Elberry <i>et al.</i> , 2015 ; Yousefi <i>et al.</i> , 2014 ; Bouterfas <i>et al.</i> , 2016).
Huiles essentielles (Eugénol)	Antioxydants, anticholinestérase, antibactérienne	(Orhan <i>et al.</i> , 2010 ; Kadri <i>et al.</i> , 2011 ; Bokaeian <i>et al.</i> , 2014).

L'analyse phytochimique préliminaire des extraits avec les solvants polaires (aqueux, éthanolique, méthanolique) et moyennement polaires (Dichlorométhane, n-Butanol) a permis de détecter plusieurs groupes des métabolites secondaires, dont les alcaloïdes, flavonoïdes, mucilage saponosides, anthraquinones, quinones et tanins. (Tableau 3).

L'extrait méthanolique s'est révélé être le plus riche, contenant huit des onze groupes recherchés, notamment les alcaloïdes, flavonoïdes, Mucilage, saponosides, tanins, Terpénoïdes, polyphénols (tableau 3). Cela suggère, que l'extrait méthanolique, en tant que solvant polaire, est particulièrement efficace pour extraire un grand divers composés bioactifs.

L'extrait aqueux (EAQ), est également polaire, présente une composition similaire, avec une détection des polyphénols, mucilage, flavonoïdes et saponosides. Les extraits au butanol (EBuOH) et l'éthanolique montrent une composition plus restreinte indiquant une affinité moindre avec certains métabolites. En revanche, l'extrait au dichlorométhane (EDcM), moyennement polaire révèle une quasi-absence, sauf une légère présence des polyphénols et saponosides, ce qui confirme que les composés polaires ne sont pas bien extraits par des solvants apolaires.

La nature chimique des solvants influence fortement le profil phytochimique des extraits, en mettent en évidence l'importance de choisir un solvant adapté selon le type de métabolites recherchés.

Tableau03 : Dépistage phytochimique des extraits de *Marrubium vulgare* (Ghedabra, 2018)

	EEp	EDcM	EBuOH	EMeOH	EAQ
Alcaloïdes	–	–	–	+	–
Flavonoïdes	–	–	+	+	+
Mucilage	–	–	–	+	+
Saponosides	–	–	–	+	+
Anthra- Quinones	–	+	–	–	–
Tanins galliques	–	–	+	+	+
Tanins catéchiques	–	–	–	+	+
Terpénoides	+	+	–	+	–
Coumarines	–	–	–	–	–
Quinones libres	–	–	–	–	–
Polyphénols	+	+	+	+	+

(+) Présence, (-) Absence, (EEp)Extrait éthanolique, (EDcM) Extrait de dichlorométhane (EBuOH) Extrait de n-butanol, (EMuOH) Extrait méthanolique, (EAQ)Extrait aqueux

1.2.7 Activités biologiques de *Marrubium vulgare*

Marrubium vulgare possède plusieurs activités biologiques remarquables :

- **Activité anticoagulante** : Elle est considérée comme une source naturelle importante de composés anticoagulants, principalement en raison de sa richesse en composés phénoliques (Ghedabda *et al.*, 2014).
- **Activité antioxydante** : Des études *in vitro* ont mis en évidence une forte activité antioxydante des extraits éthanolique et acétonique de la plante.
- **Activité anticancéreuse** : Plusieurs recherches ont rapporté la capacité de cette plante à inhiber la prolifération de lignées cellulaires du cancer du col de l'utérus.
- **Activité anti-inflammatoire** : Une étude *in vitro* a démontré que certains composés présents dans la plante inhibent la formation de médiateurs inflammatoires tels que les prostaglandines et la peroxyasaldine, impliqués dans la production d'intermédiaires inflammatoires.

- **Activité antidiabétique** : L'administration orale d'extraits méthanoliques a entraîné une diminution significative du taux de glucose sanguin, de l'urée sérique, ainsi qu'une amélioration du profil lipidique chez des rats diabétiques. Ces extraits ont également stimulé l'absorption du glucose par le foie et les muscles squelettiques.
- **Activité antimicrobienne** : L'extrait méthanolique de Marrube blanc a montré une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis*. De plus, l'huile essentielle a présenté une activité significative contre des bactéries Gram positives, contre des levures notamment *Aspergillus niger* et *Candida albicans*, ainsi que contre des champignons dermatophytes (**Aćimović et al., 2020**).

1.2.8 Contre-indications et effets indésirables

Il est généralement recommandé aux femmes enceintes d'éviter la consommation de marrube blanc. En effet, selon la Commission Européenne, cette plante pourrait stimuler l'utérus et exercer une action abortive. Toutefois, la même source précise qu'aucun effet indésirable n'a été observé à ce jour chez les autres catégories de population (**Djahra, 2014**).

Chapitre 2

Les bactéries multirésistantes

2.1 Définition de résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne correspond à la capacité intrinsèque (naturelle) ou acquise de certaines souches bactériennes à s'échapper à l'action inhibitrice ou bactéricide d'un ou plusieurs agents antimicrobiens. Elle résulte de modifications génétiques, telles que des mutations chromosomiques ou l'acquisition de gène de résistance par transfert horizontal. Ce phénomène, préoccupant sur le plan de la santé publique, est en grande partie favorisé par l'usage inapproprié ou excessif des antibiotiques en médecine humaine, vétérinaire et dans l'agriculture (OMS, 2020).

2.1.1 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

2.1.1.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

L'inactivation enzymatique des antibiotiques constitue le principal mécanisme de résistance, notamment pour les beta -lactamines, les aminosides et les phénicolés. Ce type de résistance est également observés pour les macrolides, les lincosamides, les tétracyclines et, plus récemment, les fluoroquinolones. Bien que ce mécanisme ne soit pas pas le plus fréquent pour ces dernières, il reste significatif. L'enzyme agit en modifiant le noyau actif de l'antibiotique ,soit en le scindant, soit en lui ajoutant un groupement chimique, ce qui empêche son interaction avec la cible bactérienne et entraîne une perte d'activité, parmi les réactions enzymatiques impliquées, on retrouve l'hydrolyse, l'acétylation, la phosphorylation, la nucléotidylation l'estérification, la réduction et l'ajout d'un glutathion .Ces enzymes sont généralement associés à des éléments génétiques mobiles(Muylaert et Mainil, 2012).

2.1.1.2 Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique

L'antibiotique peut voir sa cible modifiée ou remplacé de manière structurelle, empêchant ainsi son action antibactérienne au niveau de la bactérie.

Ce mécanisme de résistance observé pour presque tous les antibiotiques, joue un rôle clé notamment dans la résistance aux pénicillines, aux macrolides du groupe MLS chez les bactéries Gram-positives, ainsi qu'aux phénico les et aux tétracyclines chez les bactéries Gram-négative. Cette résistance peut résulter soit de l'acquisition de matériel génétique mobile codant une enzyme altérant la cible de l'antibiotique, soit de mutations affectant la séquence nucléotidique de cette cible. Dans certains cas la cible est complètement remplacée, comme cela est observé avec les sulfamides et les beta-lactamines. Par exemple, la méticilline ne parvient plus à inhiber *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (*SARM*) en raison de la production d'une nouvelle protéine de liaison à la pénicilline (PBP) qui empêche son action (Muylaert et Mainil, 2012).

2.1.1.3 La diminution de la perméabilité cellulaire

La diminution de la perméabilité cellulaire résulte d'une réduction de l'entrée de l'antibiotique à son site d'action, due à une modification de la perméabilité de la membrane interne ou externe de la bactérie. Une altération des porines présentes dans la paroi des bactéries à gram négatif peut limiter, voire empêchera la pénétration de l'antibiotique jusqu'à son site cible. Ce type de résistance concerne généralement plusieurs antibiotiques appartenant à différentes classes, car de nombreux médicaments empruntent les mêmes porines. Toutefois, certaines résistances sont spécifiques lorsqu'un seul agent passe par une porine donnée. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* présente une résistance spécifique à l'imipénème lorsqu'elle perd une porine particulière (Sylvie, 2009).

2.1.1.4 Pompe d'efflux

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques en les expulsant activement grâce à des transporteurs présents dans leur membrane, appelés pompes d'efflux. Ces protéines peuvent être spécifiques à une seule classe d'antibiotiques, ou au contraire, rejeter plusieurs types à la fois, provoquant une résistance multidrogue (MDR). Pour fonctionner, ces pompes utilisent différentes sources d'énergie : certaines exploitent le gradient de protons (familles MFS, RND et SMR), d'autres le gradient d'ions sodium (famille MATE), et d'autres encore l'hydrolyse de l'ATP (famille ABC). Ces systèmes remplissent aussi des fonctions physiologiques importantes, comme la protection contre des substances toxiques de l'environnement et le maintien de l'équilibre interne (homéostasie), ce qui peut indirectement renforcer leur virulence (Cattoir, 2004).

2.2 Les bactéries multirésistantes (BMR)

Elles sont considérées comme des bactéries résistantes à au moins une molécule d'antibiotiques appartenant à plus de 3 classes différentes parmi les classes habituellement active sur cette bactérie (Garnier, 2020).

Les bactéries les plus isolés :

- **Les entérobactéries productrices de BLSE**

C'est un groupe des bactéries ont la capacité de produire des bêta lactamases à spectre élargie qui sont des enzymes hydrolysantes l'ensemble des pénicillines et les céphalosporines à l'exception des céphamycines (céfotixine, céfotétan), du moxalactam et des carbapénèmes (Mariani- Kurkdjian *et al.*, 2012). Ces bactéries sont retrouvées essentiellement dans la

famille des entérobactéries, principalement *Escherichia coli* et *Klebsiella* (Figure10), plus rarement *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* ou des bactéries Gram négatif non fermentatives comme *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et d'autres. Ce groupe des bactéries adoptent diverses stratégies pour acquérir une résistance aux antibiotiques : elles peuvent rencontrer des problèmes de perméabilité qui limitent l'entrée de l'antibiotique dans la bactérie, mettre en place des systèmes d'efflux pour éliminer les antibiotiques déjà introduits dans la bactérie, ou modifier la cible bactérienne affectée par l'antibiotique (par exemple : les sites de liaison affectés par les pénicillines, également appelés protéines de liaison des pénicillines (PBP), ce qui empêche la production de la paroi cellulaire de la bactérie, ou altérer la gyrase ciblée par les quinolones). Cependant, on parle le plus souvent d'enzymes qui dégradent les bêtalactamines, connues sous le nom de bêtalactamases (**Vora et Auckenthaler, 2009**).

En milieu hospitalier, les BLSE sont souvent à l'origine d'infections des voies urinaires (cystites, pyélonéphrites) qui peuvent parfois être compliquées par des bactériémies, notamment lors d'interventions invasives telles que les biopsies de prostate ainsi que des infections au niveau du site opératoire, des pneumonies acquises à l'hôpital, ainsi que des infections liées aux cathéters. De nombreuses recherches ont démontré que chez les patients atteints d'infections à BLSE, on note une mortalité accrue, une durée d'hospitalisation prolongée, des coûts plus importants et un taux de guérison réduit (**Vora et Auckenthaler, 2009**).

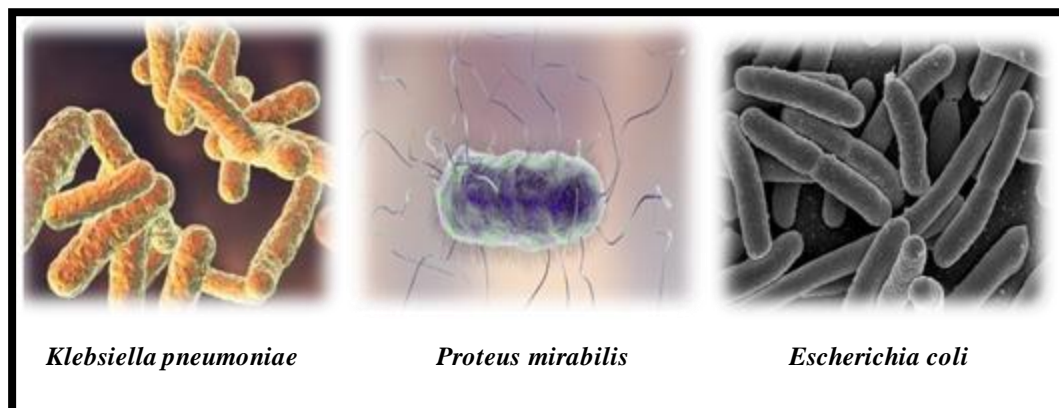


Figure 10 : des entérobactéries observées au microscopie électronique

([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:E. coli Bacteria \(7316101966\).jpg?uselang=fr](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:E._coli_Bacteria_(7316101966).jpg?uselang=fr)

<https://prevent-and-protect.com/pathogen/proteus-mirabilis-en/>

<https://www.elsan.care/fr/nos-actualites/klebsiella-pneumoniae-bacterie-resistante-des-poumons-et-voies-urinaires>)

- ***Acinetobacter baumannii***

C'est une bactérie coccobacille Gram négatif non flagellée (Figure 11), omniprésente et souvent isolée dans l'environnement. En médecine humaine, ce micro-organisme opportuniste est à l'origine d'infections nosocomiales et extrahospitalières. Sa résistance aux antibiotiques de dernier recours tels que la colistine, la tigécycline et les carbapénèmes en fait un des agents pathogènes nosocomiaux les plus préoccupants. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) la classe parmi les bactéries nécessitant en urgent des recherches pour le développement de nouveaux antibiotiques, tandis que les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) la perçoivent comme une menace pressante pour la santé publique. La capacité d'*Acinetobacter baumannii* à former des biofilms et à résister à la dessiccation ainsi qu'aux désinfectants est particulièrement préoccupante, car elle lui permet de se développer en milieu hospitalier. Sa résistance aux antibiotiques, sa persistance dans l'environnement et l'absence de toxines connus comme dangereuses pour l'hôte suggèrent que son pouvoir pathogène repose principalement sur ces mécanismes de persistance et de résistance (**Whiteway et al., 2020**).

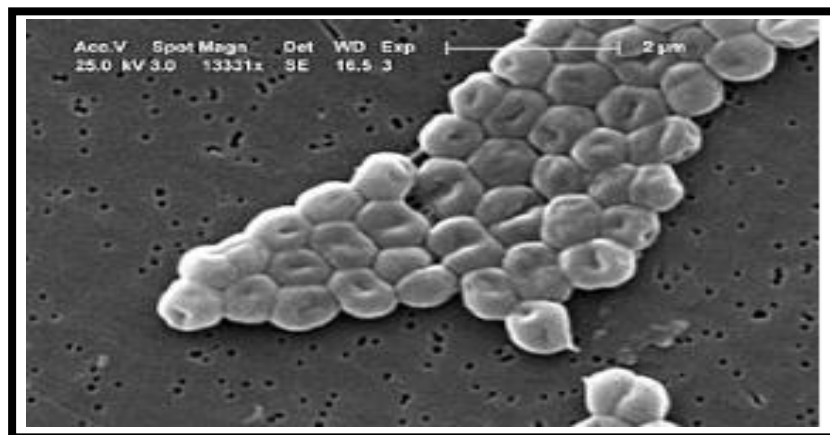


Figure 11 : *Acinetobacter baumannii*. Observé au microscope électronique

Grossissement x13331

(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/87/Acinetobacter_baumannii.JPG/330px)

- ***Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (SARM)**

Staphylococcus aureus est une bactérie Gram positive, sphérique, immobile, qui forme des chaînes et des grappes (figure 12) (**Chow, 2020**).

La résistance de *S. aureus* à la méticilline est liée à la synthèse d'une protéine de liaison à la méticilline la PLP2a ; qui entraîne une résistance à l'ensemble des bêtalactamines disponibles (**Tatteuin, 2011**).

Ce germe n'entraîne pas d'infection spécifique, comme tous les staphylocoques dorés il peut être responsable d'infections variées comme les infections pulmonaires, infections de plaies traumatiques ou chirurgicales, d'abcès, d'infections ostéoarticulaires, d'infections de matériel invasif (cathéter, sonde vésicale, sonde d'intubation etc.) de bactériémies ou d'endocardite. Les infections par les SARM entraînent des séjours hospitaliers plus longs et un coût de traitement plus important (Engemann *et al.*, 2003).



Figure 12 : SARM observé au microscope électronique grossissement x2000

(https://fr.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus_r%C3%A9sistant_%C3%A0_la_m%C3%A9ticilline#cite_ref-20)

- ***Enterococcus faecalis***

C'est une bactérie à gram positif, en forme de coques, immobiles et acapsulés (figure 13), anaérobie facultatif aérobies tolérants. C'est l'espèce d'*Enterococcus* le plus isolée chez l'homme, principalement impliqué dans des infections urinaires, souvent consécutives à des explorations urologiques. Il peut aussi provoquer des endocardites à évolution subaigüe, touchant des valves cardiaques natives ou des prothèses. D'autres infections peuvent survenir après des explorations digestives ou urologiques, notamment des infections intra-abdominales (biliaires, etc) ainsi que des diverses suppurations. Les surinfections impliquant *Enterococcus* sont souvent polymicrobiennes, associant fréquemment des entérobactéries et des bactéries anaérobies. Ces infections sont d'origine nosocomiales.

E. faecalis présente une résistance naturelle à plusieurs classes d'antibiotiques, en particulier les bêta-lactamines, les aminosides, les macrolides ainsi que le cotrimoxazole. La résistance observée aux pénicillines G et A s'explique par la production d'une pénicillinase, enzyme capable d'inactiver ces molécules. Par ailleurs, la résistance aux macrolides est liée à une

modification de la cible ribosomale, induite par l'action d'une méthylase, empêchant ainsi la fixation de l'antibiotique sur son site d'action (Archambaud et Clave, 2007).



Figure 13 : *Enterococcus faecalis* observé au microscope électronique grossissement 10000x

(<https://prints.sciencesource.com/featured/3-enterococcus-faecalis-sem-oliver-meckes-eye-of-science.html>)

Matériel et méthodes

1. Lieu d'étude

L'étude a été faite au niveau de laboratoire de Microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au Biomédicale, et à l'environnement « LAMAABE » de la faculté SNV/STU à l'université de Tlemcen.

2. Matériel

2.1 Matériel biologique

2.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des feuilles de la plante « *Marrubium vulgare* ». Cette dernière a été récolté de la région de Maghnia (Wilaya de Tlemcen) au mois de février.

L'identification a été faite par Dr Baba Ali Ibrahim, affilié au département d'écologie de la faculté SNV/STU à l'université de Tlemcen.

2.1.2 Souches bactériennes

Les bactéries utilisées pour déterminer l'activité antibactérienne sont 7 souches de référence (tableau 4) et 6 souches cliniques multirésistantes isolées et édentifiées des services de réanimation et des urgences médicales et chirurgicales (UMC) de CHU de Tlemcen (tableau 5). Les souches d'origine hospitalier sont identifiées moléculairement par Dr Ayad.

Tableau 04 : Référence et origine des souches de référence testées

Nom de souche	Gram	La référence
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positive	ATCC 29212
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positive	ATCC 29213
SARM	Positive	ATCC 12493
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négative	ATCC 700 603
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négative	ATCC 27 853
<i>Escherichia coli</i>	Négative	ATCC 25922
<i>Escherichia coli TEM</i>	Négative	ATCC 35218

Tableau05 : Référence et origine des souches pathogènes testées

Code	Nom de souche	Gram	Service	Origine
10SR	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positive	Réanimation	Bord de lit
Pstu1	<i>Providencia stuartii</i>	Négative	Réanimation	Aspiration trachéale
Kp27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négative	Réanimation	Aspiration trachéale
E2	<i>Escherichia coli</i>	Négative	UMC	Abcès périanal
A8	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Négative	Réanimation	Aspiration trachéale
Ec8	<i>Enterobacter cloacae</i>	Négative	Réanimation	Table de couloir

2.1.3 Milieux de culture

2.1.3.1 Milieux de culture liquides

- Mueller Hinton liquide
- Bouillon de Cœur-Cervelle (BHIB)

2.1.3.2 Milieux de culture solide

- Bile-esculine-azoture (BEA)
- MacConkey
- Mueller Hinton
- Chapman

2.2. Antibiotiques

Les antibiotiques en disques utilisés dans cette étude sont :

- Pénicilline G 10µg REF 061007
- Amoxicilline 30µg REF \$9005
- Oxacilline 1µg REF 061074
- Méropénème 10µg REF 061058

2.3 solvants chimiques

1.3.1 Solvant polaires

- Eau distillée
- Méthanol 70%
- Ethanol 70%

2.3.2 Solvants moyennement polaires

- Chloroforme
- Dichlorométhane
- Acétate d'éthyle

2.3.3 Solvants apolaires

- Hexane

3. Méthodes

3.1 Préparation des souches bactériennes

- Revivifier des souches conservées à partir de la gélose profonde par ensemencement dans des tubes contenant 5ml de BHIB liquide ;
- Incuber à 37°C avec agitation pendant 24h ;
- Les cultures positives ont été ensemencées par épuisement sur des boîtes de Pétri contenant différents milieux sélectifs : milieu MaCkoncey pour les bactéries à Gram négatif, milieu Chapman pour les staphylocoques et milieu BEA pour *E. faecalis*
- Incuber les boîtes à 37°C pendant 48 h pour les staphylococcus et pendant 24 h pour les autres.

3.2 Préparation de matériel végétale

Les feuilles collectées sont séchées à l'obscurité à température ambiante, dans un endroit sec et broyées en poudre à l'aide d'un broyeur électrique (figure 14).

La poudre obtenue a été tamisée par un tamis pour fournir une poudre homogène qui a été conservée dans un flacon en verre à 4°C jusqu'à son utilisation.



Figure 14 : Préparation de matériel végétale

3.2.1 Délipidation

La délipidation est l'élimination des lipides présents dans la plante qui peuvent interférer avec la solubilité des composés actifs.

Cette étape a été faite au laboratoire pédagogique de biochimie de la faculté SNV/STU de l'université de Tlemcen par utilisation d'appareil de Soxhlet (figure 15) en utilisant l'hexane comme solvant.

La délipidation a été faite pendant 6 heures, suivie par un séchage de la plante pendant 8 h à 40° C.

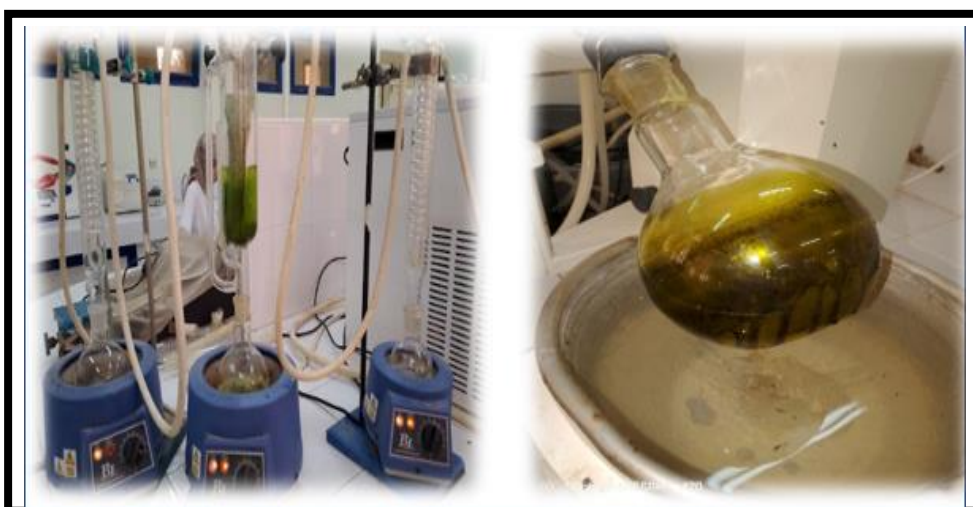


Figure 15 : Processus de délipidation par Soxhlet

3.2.2 Macération

Principe

La macération représente la technique d'extraction solide-liquide la plus élémentaire. Cette méthode implique le contact du matériel végétal avec le solvant, avec ou sans agitation. Bien que cette opération soit généralement longue et souvent peu rentable, elle est privilégiée pour l'extraction de molécules sensibles à la chaleur (Leybros & Frémeaux, 1990). Il est crucial de choisir un solvant adéquat pour la macération, car celui-ci déterminera les catégories phytochimiques extraites des échantillons (Bitwell *et al.*, 2023).

3.2.2.1 Macération sans délipidation

- Les extraits sont préparés en mélangeant 20 g de la poudre de plante non délipidée avec 200ml du solvant dans des erlenmeyer.
- Emballer les erlenmeyers avec du papier aluminium afin d'éviter l'oxydation.
- Dépôt des erlenmeyers dans l'étuve agitatrice, laisser les agiter pendant 48h à 72 h à 18°C (figure 16).

3.2.2.2 Macération après délipidation

Le même protocole cité ci-dessous est répété sauf que la poudre de plante utilisée est la poudre délipidée avec un rapport de 10g de la matière sèche dans 100mL du solvant.



Figure 16 : Les étapes de macération

3.2.3 Filtration des extraits

Après macération, les extraits sont filtrés plusieurs fois, en commençant par un passoir pour la filtration des grosses molécules solides suivie d'une plusieurs filtrations par papier filtre (figure 17).

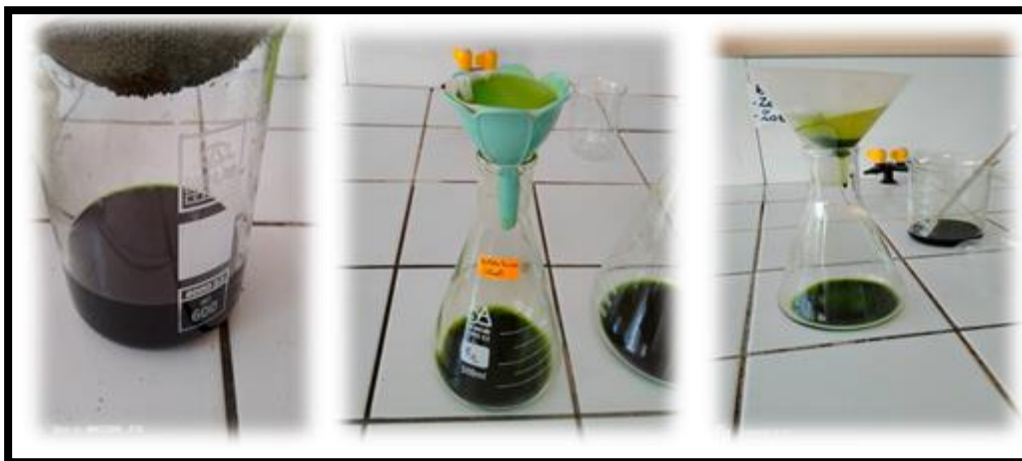


Figure 17 : L'étape de filtration

3.2.4 Evaporation

- Pour les extraits éthanolique, méthanolique, d'hexane, de dichlorométhane, d'acétate d'éthyle et de chloroforme, l'évaporation est réalisée en utilisant un évaporateur rotatif (figure 18) à 50°C au niveau du laboratoire pédagogique de biochimie de la faculté SNV/STU. Cette étape est suivie d'une évaporation dans l'étuve : les mélanges sont vidés dans des boîtes de pétri en verre et séchées dans l'étuve à 44°C jusqu'à l'évaporation totale des solvants.
- Pour l'extrait aqueux, l'évaporation a été réalisée seulement dans l'étuve à 44°C.



Figure 28 : les étapes de l'évaporation

3.2.5 Récupération de l'extrait sec

Après évaporation les boites de pétri ont été grattées pour récupérer des extraits sec (figure 19), les extraits récupérés sont conservés à 4°C jusqu'à leurs utilisations.

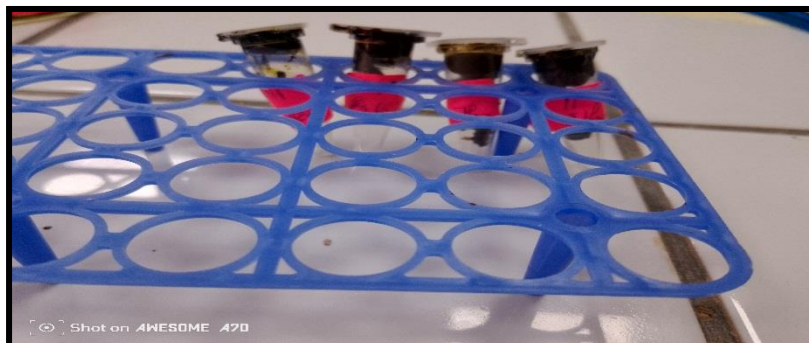


Figure19 : les extraits secs de *Marrubium vulgare*

3.2.6 Calcule de rendement

Le rendement de chaque extrait est calculé selon la loi suivante

$$\text{Rendement (\%)} = [(P1-P0)] / P \times 100$$

P : Poids de l'extrait brut sec(g), **P0** : Poids de boite vide (g), **P1** : Poids de boite après évaporation totale de l'extrait (g).

3.3 Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'effet antibactérienne des extraits de *Marrubium vulgare* est réalisée en deux étapes : une première étape correspondant à un test initial de sensibilité (méthode des disque) suivie d'une deuxième étape en déterminant les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

3.3.1 Méthode de diffusion de disque sur milieu solide

➤ Préparation des dilutions

Une série des dilutions (50, 20,10 mg/mL) a été préparés pour les trois extraits (aqueux, éthanolique et méthanolique).

➤ Préparation de l'inoculum

A partir des souches pures et jeunes de 24h, préparer dans de l'eau physiologie une suspension bactérienne de 0,5 MacFarland (figure 20) qui corresponde à $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (unités formant colonie par ml).



Figure 20 : Appareil de MacFarland

➤ Préparation des disques

- Découper des disques de 6mm de diamètre de papier de wattman.
- Stériliser les disques dans l'autoclave 20min à 120°C.

➤ Test de l'activité antibactérienne

- A partir de la suspension bactérienne de 0,5 MacFarland, ensemercer par écouvillonnage des boîtes de pétri préalablement remplies de 20 mL de la gélose Mueller-Hinton ;
- A l'aide d'une pince stérile déposer 3 disques stériles ;
- Remplir chaque disque par 5µL de l'extrait à des concentrations différentes ;
- Déposer les disques des antibiotiques témoin : Amoxicilline et Ampicilline pour les bactéries à Gram négatif ; Pénicilline G et oxacilline pour les bactéries à Gram positif ;
- Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 h ;
- Après incubation mesure des diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle.

3.3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

La technique de micro dilution en milieu liquide est considérée comme la méthode de référence pour déterminer la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien inhibant la croissance visible de la bactérie testée (WOAH, 2019).

➤ Préparation de la solution mère

Mélanger 0,4g de chaque extrait (aqueux, éthanolique, méthanolique) avec et sans délipidation avec 1ml d'eau distillé stérile. Homogénéiser les six solutions à l'aide d'un vortex jusqu'à dissolution totale

➤ Préparation de l'inoculum

A partir des souches pures et jeunes de 24h, préparer dans de Mueller-Hinton liquide une suspension bactérienne à turbidité de [0,08_0,1] UFC.

➤ Technique de CMI

- Des microplaques de 96 puits ont été utilisées pour réaliser les CMI des trois extraits de *Marrubium vulgare* (aqueux, éthanolique, méthanolique) ;
 - Des solutions des extraits ont été préparés avec une concentration de 400mg/mL ;
 - Dans la première colonne de la microplaque, colonne de premier témoin négatif, 50µl de bouillon Muller Hinton a été distribués avec 50µL de l'extrait ;
 - Dans la deuxième colonne 50µL de Mueller-Hinton liquide ont été distribués ;
 - 50µL de l'extrait sont introduites dans le troisième puits. Après avoir bien homogénéisé le contenu de ce puits, une série de dilution est réalisée où 50µL sont prélevés, puis déposé dans le puits suivant, et ainsi de suite jusqu'au 11^{ème} puits où 50µL restantes sont éliminés.
 - Dans la dernière colonne de témoin positive, 50µL de bouillon Muller Hinton a été distribué avec 50µL de la souche ;
 - 50µL de l'inoculum bactérien de 0,5 Mc Ferland ont été ajoutés dans chaque puits sauf les colonnes des témoins négatifs. Ce qui a permet d'obtenir des dilutions en série de progression géométrique de raison 1/2 allant de 100 mg/mL au 0,4 mg/mL ;
 - Les microplaques ont été scellées et incubées à 37°C pendant 18 à 24h.
- **Lecture**

La CMI est la plus faible concentration de l'extrait de *Marrubium vulgare* où il n'y pas de croissance bactérienne visible.

Résultats et discussion

1. Souches bactérienne étudiées

Les aspects des souches testées sur milieux sélectifs varient selon le type de la bactérie (figure 21). Sur milieu MacConkey, *Escherichia coli* donne des colonies rose vif à rouge, *Klebsiella pneumoniae*, apparaît sous forme de grandes colonies muqueuses rose, *Enterobacter cloacae* produit des colonies de teint pâle à modérément foncée, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* forme des colonies de couleur verte. Sur milieu Chapman, *Staphylococcus aureus* forme des colonies jaune doré et sur milieu Bile-Esculine Agar *Enterococcus faecalis* forme de petites colonies grisâtres à noirâtres.

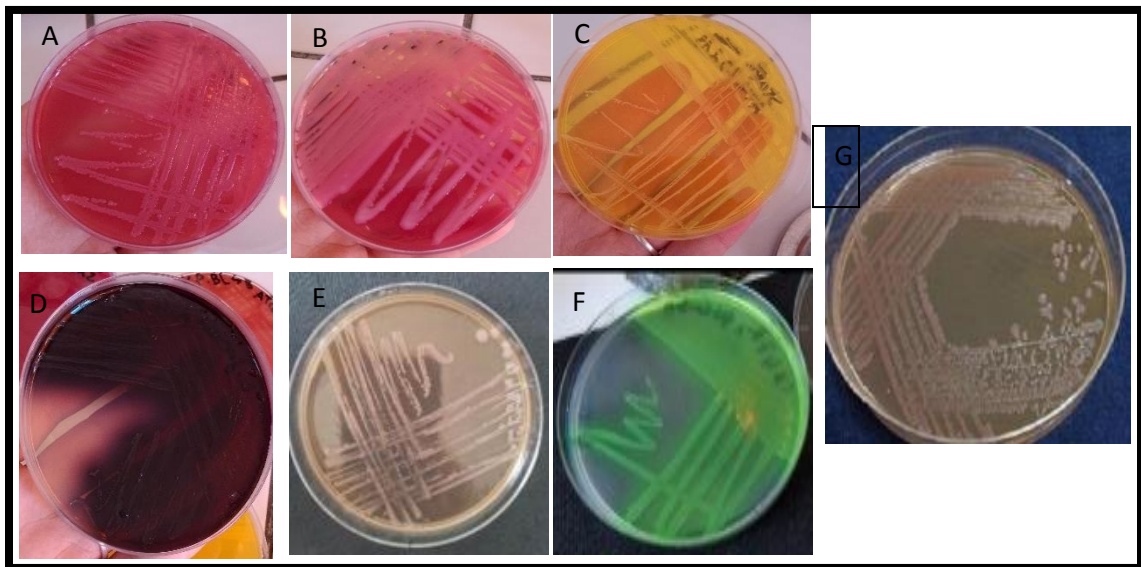


Figure 21 : Aspects des souches étudiés sur leurs milieux sélectifs

A : *Escherichia coli*, **B** : *Klebsiella pneumoniae*, **C** : *Staphylococcus aureus*

D : *Enterococcus faecalis*, **E** : *Enterococcus cloacae*, **F** : *Pseudomonas aeruginosa*,
G: *Acinetobacter baumannii*

2. Aspect des extrait obtenus

L'extraction par macération à permet d'obtenir des différents extraits selon le solvant utilisé. La couleur et l'aspect de chaque extrait sont représentés dans le tableau 6.

Tableau 06 : La couleur et l'aspect des extraits de *Marrubium vulgare*

Extrait	Couleur	Aspect
Aqueux	Marron	Pâteux
Ethanolique	Vert	Pâteux
Méthanolique	Marron	Pâteux
Hexane	Jaune verdâtre	Huileux
Dichlorométhane	Jaune	Huileux
Acétate d'éthyle	Vert	Huileux
Chloroforme	Vert	Huileux

3. Rendement

Le rendement a été déterminé par rapport à 20g des feuilles sans délipidation de *Marrubium vulgare* et 10g des feuilles après délipidation de la plante.

Les résultats présentés dans l'histogramme ci-dessous (figure 22) indiquent que la délipidation n'a pas entraîné de variation significative des rendements d'extraction. Toutefois, une nette différence est observée entre les types d'extraits : les extraits polaires présentent les rendements les plus élevés, atteignant jusqu'à 15%, tandis que les extraits moyennement polaire et apolaire affichent des rendements nettement plus faibles variant de 0,31 à 2,85. Ces résultats suggèrent que les composés majoritairement extraits sont de nature polaire.

Les solvants polaires offrent des rendements supérieurs aux solvants apolaires, car ils peuvent se propager dans la poudre végétale, atteindre la matrice végétale et extraire ainsi un maximum de métabolites. En revanche, les solvants apolaires ne possèdent pas cette capacité en raison de la présence probable d'eau dans le tissu végétal. Comme l'eau est non soluble dans les solvants apolaires, cela entrave leur progression à travers le solide et ralentit donc leur diffusion (Chemat *et al.*, 2012 ; Patel et Rani, 2013).

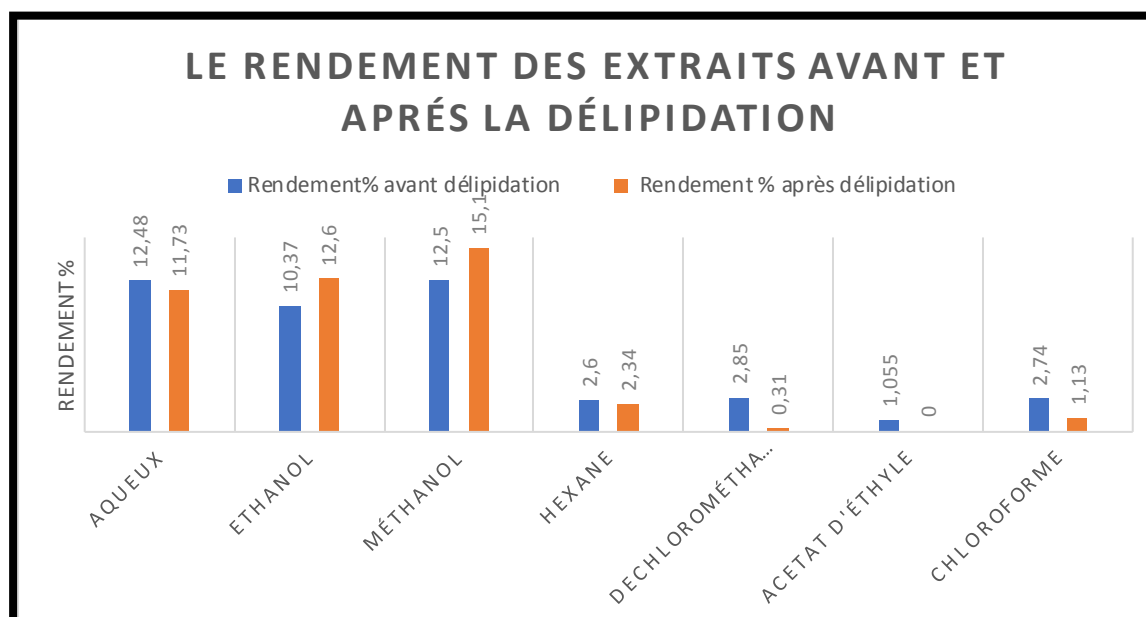


Figure 22 : Le rendement des extraits de *Marrubium vulgare* avant et après délipidation

Les résultats des rendements des extraits apolaire et moyennement polaire sont en accord avec ceux rapportés au paravent dans une étude menée sur les plantes *Aegles marmelos* et *syzygium cumini*, où après macération de poudre sèche avec les solvants de polarité croissante : Hexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle, les rendements des extractions étaient respectivement les suivants : de 0,1%, 0,15%, et 2% (**Anandharajan et al., 2006**).

Anandharajan et ses collaborateurs ont montrés que le taux d'extraction s'accroît lorsque les solvants sont combinés à l'eau. On peut attribuer ce comportement à la présence d'eau (possédant un moment dipolaire plus fort que celui des alcools) qui déstabilise les membranes cellulaires. Par conséquent, en s'enfonçant davantage dans la matrice végétale, le solvant peut interagir avec une plus grande quantité de soluté, ce qui favorise le processus d'extraction.

Nos résultats des rendements satisfaisants des extraits polaires sont en accord avec des études ultérieurs où après macération de *Marrubium vulgare* avec l'eau, l'éthanol et méthanol des rendements de 12% ,2,1%, 10,04 respectivement sont obtenus (**Ghedabda, 2018 ; Boureneb et al., 2023**).

Le calcul de rendement repose sur plusieurs paramètres : la nature et les caractéristiques physico-chimiques des solvants, la période et le lieu de récolte, la durée de séchage, le climat ainsi que la composition chimique de la plante (**Ghedabda, 2018**).

4. Activité antibactérienne

4.1 Résultat de méthode de diffusion de disque

4.1.1 Activité antibactérienne des extraits de la plante sans délipidation

Les résultats mentionnés dans les tableaux (7 et 8) et figure 23 montrent que pour l'ensemble des extraits sans délipidation de la plante, aucune activité n'a été mentionnée.

Tableau 07 : Résultat de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé contre les souches de référence.

Bactéries	Les dilutions (mg /mL)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			Témoin (mm) Amoxicilline / Pénicilline G*
		Aqueux	Ethanol	Méthanol	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10	06	06	06	06
	20	06	06	06	06
	50	06	06	06	06
<i>E. coli</i> TEM ATCC 35212	10	06	06	06	06
	20	06	06	06	06
	50	06	06	06	06
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	10	06	06	06	24*
	20	06	06	06	24*
	50	06	06	06	24*
SARM ATCC 12493	10	06	06	06	06*
	20	06	06	06	06*
	50	06	06	06	06*
<i>E. fecalis</i> ATCC 29212	10	06	06	06	06*
	20	06	06	06	06*
	50	06	06	06	06*
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	10	06	06	06	06
	20	06	06	06	06
	50	06	06	06	06
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SHV-12 ATCC 700603	10	06	06	06	06
	20	06	06	06	06
	50	06	06	06	06

Tableau 08 : Résultat de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé contre les souches pathogènes.

Bactéries	Dilutions (mg/mL)	Diamètre des zones d'inhibition(mm)			Témoin (mm) Méropèneme Amoxicilline*
		Aqueux	Ethanol	Méthanol	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	06	06	06	12
	20	06	06	06	13
	50	06	06	06	12
<i>Providencia stuartii</i>	10	06	06	06	32
	20	06	06	06	33
	50	06	06	06	33
<i>E.coli</i>	10	06	06	06	12
	20	06	06	06	12
	50	06	06	06	12
<i>Enterobacter cloacae</i>	10	06	06	06	06*
	20	06	06	06	06*
	50	06	06	06	06*
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	06	06	06	38
	20	06	06	06	36
	50	06	06	06	36
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10	06	06	06	06
	20	06	06	06	06
	50	06	06	06	06

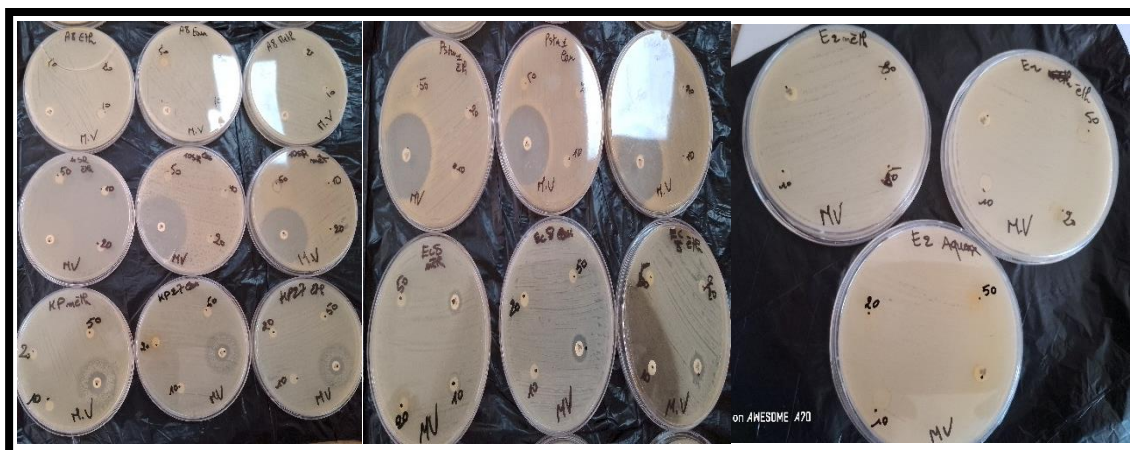


Figure 23 : Zones d'inhibition des différents extraits de *Marrubium vulgare* sans délipidation contre des souches pathogènes

4.1.2 Activité antibactérienne des extraits après délipidation de la plante

Les tableau 9 résume l'activité antibactérienne des extraits éthanolique, méthanolique et aqueux de la plante délipidée contre les souches de référence et une souche pathogène de *staphylococcus aureus*. Aucune activité n'a été détectée contre *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* TEM ATCC 35218, *Klebsielle pneumoniae* SHV-12 ATCC 700603, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. L'extrait aqueux a présenté une activité modérée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, tandis que les extraits éthanolique et méthanolique ont présenté une activité contre SARM ATCC 12493. En ce qui concerne *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, une activité modérée a été observée avec les extraits aqueux et éthanolique (figure 24).

Contre la souche clinique de *Staphylococcus aureus*, une activité moyenne est observée avec l'extrait aqueux avec une zone d'inhibition de 12mm a concentration de 50 mg/mL (figure 25). Les résultats obtenus suggèrent que la moindre sensibilité des bactéries à gram négatif vis-vis des extraits testés pourrait être liée à la structure particulière de leur paroi cellulaire. Les bactéries à Gram positif possèdent une paroi moins épaisse, principalement constitués de peptidoglycane, qui permet une diffusion plus facile des composés bioactifs. En revanche les bactéries à Gram négatif présentent une structure cellulaire plus complexe caractérisée par la présence d'une double membrane. La membrane externe riche en lipopolysaccharides qui agit comme une barrière empêchant l'accès des agents antimicrobienne notamment les molécules bioactives des plantes.

Tableau 09 : Résultat de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé des extraits testés.

Bactéries	Les dilutions (mg/mL)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			Témoin (mm) Amoxicilline* Oxacilline* PénicillineG**
		Aqueux	Ethanol	Méthanol	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10	06	06	06	06
	20	06	06	06	06
	50	06	06	06	06
<i>E. coli</i> TEM ATCC 35218	10	06	06	06	06
	20	06	06	06	06
	50	06	06	06	06
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	10	08	06	06	25**
	20	10	06	06	23**
	50	11	06	06	25**
SARM ATCC 12493	10	06	07	11	06**
	20	06	08	11	06**
	50	06	09	13	06**
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10	06	06	06	06*
	20	06	06	06	06*
	50	06	06	06	06*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10	07	07	06	06
	20	08	08	06	06
	50	10	09	06	06
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SHV-12 ATCC 700603	10	06	06	06	06
	20	06	06	06	06
	50	06	06	06	06
<i>Staphylococcus aureus</i> clinique	10	07	06	06	06
	20	10	06	06	06
	50	12	06	06	06

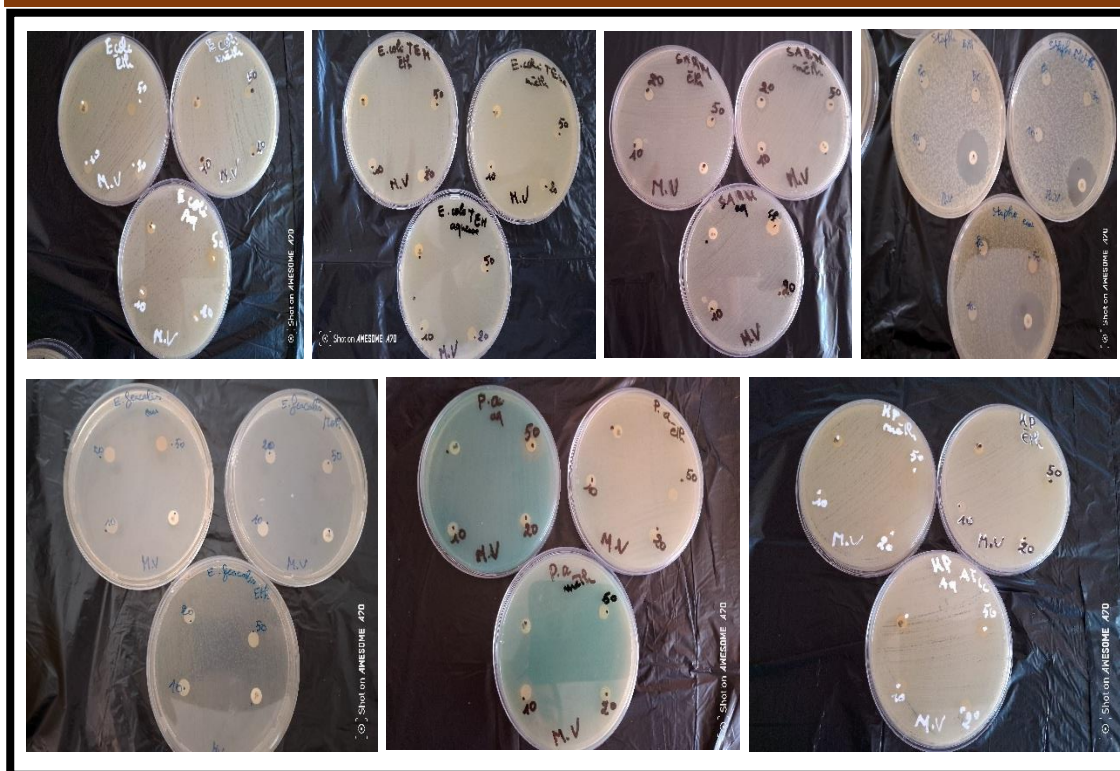


Figure 24 : Zones d'inhibition des extraits (aqueux, éthanolique, méthanolique) de *Marrubium vulgare* après délipidation contre les souches de référence

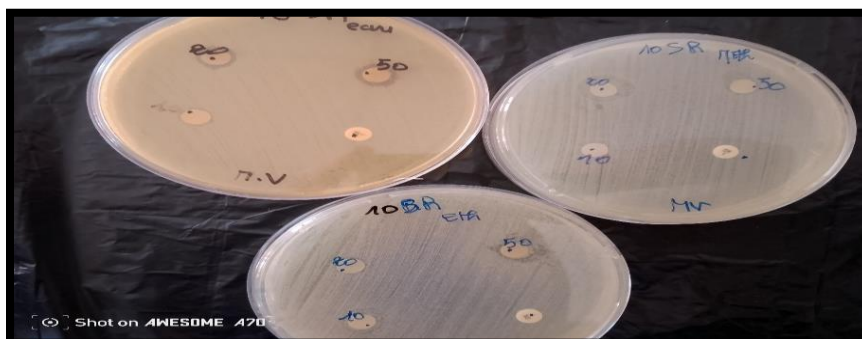


Figure 25 : Zones d'inhibition des différents extraits de *Marrubium vulgare* avec délipidation contre *Staphylococcus aureus* pathogène

4.2 Les résultats de CMI

Le résultat de tableau 10 et les figures 26 ,27 et 28 indiquent que les extraits testés ont montrés des CMI supérieures à 100 mg/mL contre la majorité des souches testées. Toutefois, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se distingue par des valeurs de CMI inférieures, avec 50 mg/mL et 100 mg/mL pour les extraits éthanolique et méthanolique avant délipidation respectivement, et une CMI de 100 mg/mL pour les extraits éthanolique et méthanolique après délipidation. En ce qui concerne les souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la

Résultats et discussions

méthicilline (SARM) ATCC 12493, une CMI de 100 mg/mL est observée pour les extraits éthanolique et méthanolique avant dilapidation, tandis qu'une CMI de 50 mg/mL est obtenue avec l'extrait méthanolique après délipidation. Ces résultats suggèrent que les lipides interfèrent avec la solubilité des composés actifs de plante.

Tableau 10 : Résultat de CMI des 03 extraits testés contre les souches de référence

Bactéries Extraits	CMI sans délipidation (mg/mL)			CMI avec délipidation (mg/mL)		
	Aqueux	Ethanolique	Méthanolique	Aqueux	Ethanolique	Methanolique
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>E. coli</i> TEM ATCC 35218	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	> 100	50	100	> 100	100	100
SARM ATCC 12493	> 100	100	100	> 100	> 100	50
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SHV-12 ATCC 700603	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Staphylococcus clinique</i>	> 100	/	/	> 100	/	/

/ : non testé

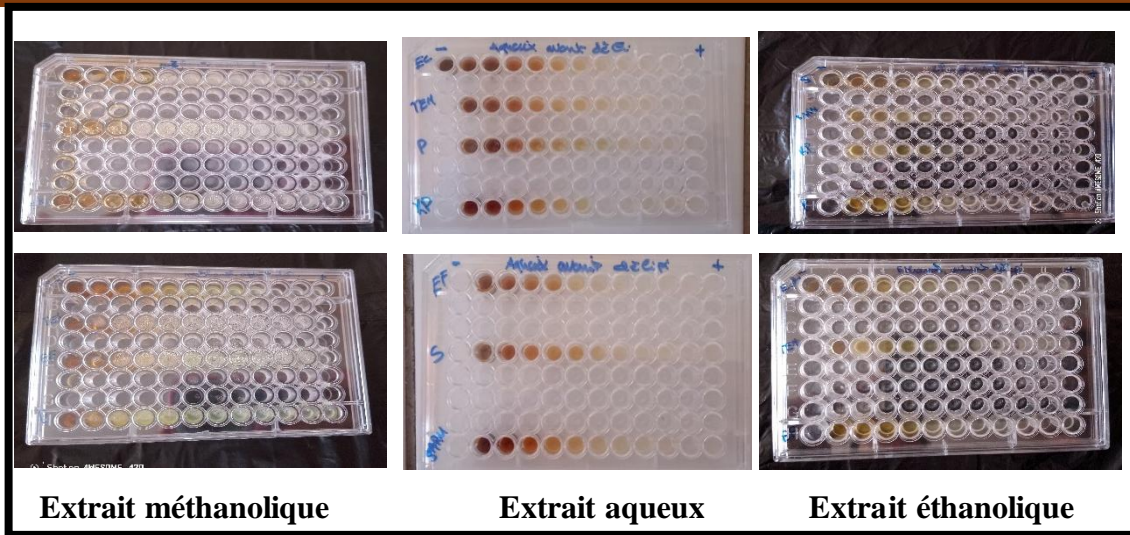


Figure 26 : CMI des extraits polaires testés sans délipidation contre les souches de référence

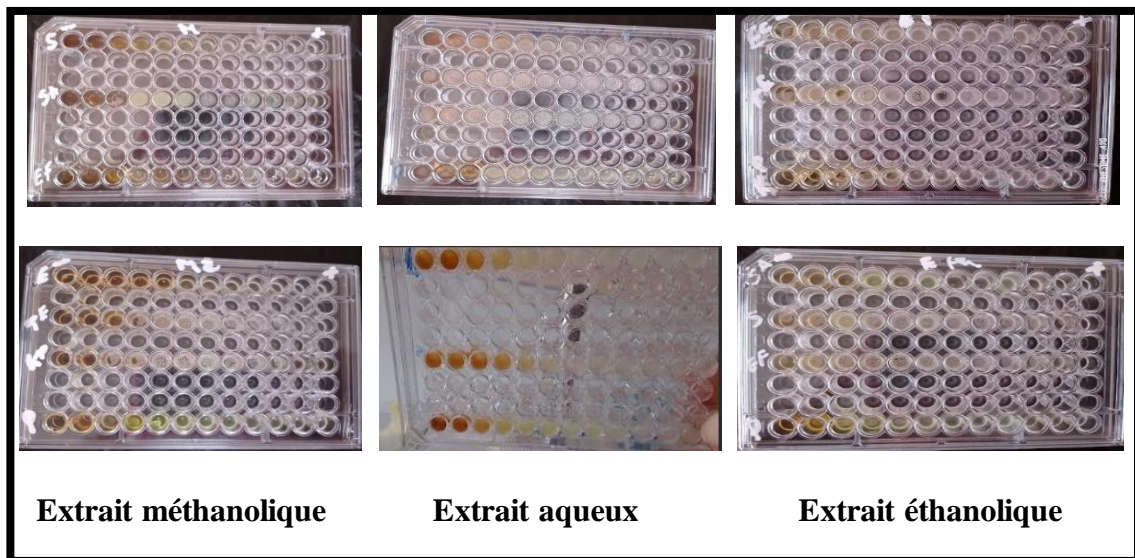


Figure 27 : CMI des extraits polaires après dilipidation contre les souches de référence

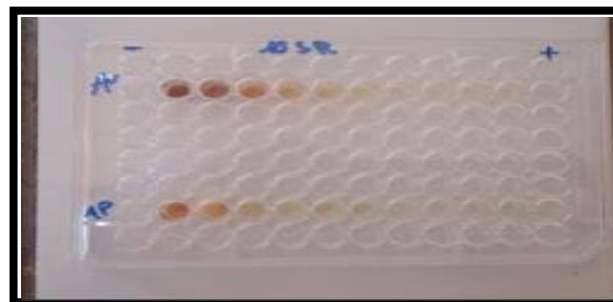


Figure 28 : CMI d'extrait aqueux contre *Staphylococcus aureus* clinique

Des études antérieures menées sur *Marrubium vulgare* (Ghedabda, 2018 ; Masoodi *et al.*, 2008) ont rapporté des résultats similaires à ceux obtenus dans notre travail. En effet, l'extrait méthanolique a démontré une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif, notamment *Staphylococcus aureus* ATCC, avec des zones d'inhibition variant entre 9 et 9,69 mm pour des concentrations de 100 mg/mL et 62,5 mg/ml respectivement, et une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 100 mg/mL. Concernant le SARM, dans l'étude de Ghedabda en 2018 une activité a été observée, avec des zones d'inhibition atteignant 16,34 mm à une concentration de 500 mg/mL de l'extrait méthanolique.

Les résultats obtenus avec les bactéries Gram négatives concordent bien avec ceux d'une autre étude où aucun effet antibactérien n'a été détecté contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Masoodi *et al.*, 2008).

Comme cité précédemment, cette différence de sensibilité entre les bactéries à Gram négatif et celles à Gram positif pourrait être expliquée par la structure de la paroi cellulaire : les bactéries Gram positif, dépourvues de membrane externe, sont généralement plus sensibles aux stress environnementaux tels que les variations de température, de pH ou encore aux composés bioactifs naturels (Balentine *et al.*, 2006).

Par ailleurs, Ghedabda et ses collaborateurs ont rapporté une absence totale d'effet de l'extrait aqueux sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25923 (Ghedabda *et al.*, 2014). Ces résultats sont en contradiction avec ceux de notre étude, dans laquelle une activité antibactérienne a été détectée contre *Pseudomonas aeruginosa* et *S. aureus*. De plus, une étude plus récente menée par Gourich et ses collaborateurs en 2023 a démontré que l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* possède une activité significative contre *P. aeruginosa* 2DT2138 et *Klebsiella pneumoniae*, avec des CMI respectives de 75 µg/mL et 18,75 µg/mL (Gourich *et al.*, 2023).

Une autre étude a montré que l'extrait éthanolique de *Marrubium vulgare* est inactif contre plusieurs souches, dont *S. aureus*, SARM, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* et *Serratia marcescens*. Cela contraste avec nos résultats, qui ont révélé une activité modérée contre SARM ATCC 12493 et *P. aeruginosa* ATCC 278535 (Ghedabda, 2018). Ces divergences pourraient s'expliquer par les différences de protocoles expérimentaux utilisés. En effet, Natarajan et ses collaborateurs ainsi que Fazeli et ses collaborateurs ont démontré que la méthode de diffusion en puits sur gélose est plus adaptée

pour évaluer l'activité des extraits aqueux et organiques (comme ceux d'*Euphorbia fusiformis* ou les extraits hydro-éthanoliques de *Rhus coriaria* et *Zataria multiflora*) que la méthode de diffusion en disque (Natarajan *et al.*, 2005 ; Fazeli *et al.*, 2007).

Ainsi, plusieurs facteurs peuvent influencer l'évaluation de l'activité antimicrobienne, notamment le type de micro-organisme ciblé, la méthode utilisée pour l'évaluation, la concentration et la nature de l'extrait, mais aussi la structure moléculaire des composés bioactifs présents dans les métabolites secondaires (Ghedabda *et al.*, 2014).

Conclusion

Conclusion

L'objectif principale de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits bruts d'une plante médicinale appartenant à la famille des lamiacées, *Marrubium vulgare*, qui est très utilisée traditionnellement pour ses propriétés médicinales. A travers une série de tests in vitro, notre étude a permis de démontrer que ces extraits possèdent une activité antibactérienne intéressante, en particulier contre certaines souches bactériennes d'intérêt clinique.

Les résultats obtenus ont révélé que les extraits bruts de Marrube blanc délipidée présentent une activité antibactériennes remarquable contre des bactéries à Gram positif, notamment *Staphylococcus aureus* et *SARM*, y compris une souche pathogène isolée de CHU de Tlemcen, impliquée dans diverses infections nosocomiales. Fait notable une activité a également observée contre *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie à Gram négatif connu par sa résistance élevée et son implication dans les infections opportunistes. Ces résultats confirment le potentiel antibactérien de cette plante dans le traitement d'infections causées par des bactéries multirésistantes.

Par ailleurs, une observation importante concerne l'effet de la délipidation sur l'efficacité des extraits. Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits avant délipidation sont négatifs. En revanche, après délipidation, une inhibition de croissance bactérienne est observée, ce qui suggère que certains lipides présente dans la plante pourrait inhiber l'effet des composés actifs. Donc cette étape est cruciale pour révéler tout le potentiel biologique des extraits végétaux.

Cette étude, bien que préliminaire, met en évidence l'intérêt pharmacologique de *Marrubium vulgare* et justifie sa valorisation dans le cadre de la lutte contre les infections bactérienne notamment celle qui sont causées par des bactéries multirésistantes. Toutefois, ce travail a été limité à l'étude des extraits bruts, sans isolement et identification des molécules responsables de l'activité observée. Ainsi plusieurs perspectives de recherche peuvent être envisagé. Il serait pertinent de poursuivre cette étude en travaillant avec ces extraits purifiés et des méthodes de fractionnement chromatographique afin d'identifier et de caractériser les principes actifs responsables du l'effet antibactérien. L'analyse chimique approfondie par HPLC, GC-MS et LC-MS/MS, permettrait d'élucider leur structure et mieux comprendre leur mécanisme d'action. De plus, l'évaluation de l'effet synergique de ces extraits avec des antibiotiques conventionnels pourrait également représenter une piste prometteuse pour renforcer l'efficacité des traitement existants.

Enfin, les résultats obtenus dans ce travail confirment que *Marrubium vulgare* représente une source naturelle potentiel de composés antibactériens et méritent une attention particulière dans le cadre de la recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques face à la résistance croissante des agents pathogènes aux antibiotiques conventionnels.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- <https://prints.sciencesource.com/featured/3-enterococcus-faecalis-sem-oliver-meckes-eye-of-science.html>
- https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/87/Acinetobacter_baumannii.JPG/330px-Acinetobacter_baumannii.JPG
- <https://www.elsan.care/fr/nos-actualites/klebsiella-pneumoniae-bacterie-resistante-des-poumons-et-voies-urinaires>
- https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.01_ANTIMICROBIAL_F.pdf
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Steven P., 2002. Botanique Acímović, M., Jeremić, K., Salaj, N., Gavarić, N., Kiprovski, B., Sikora, V., & Zeremski, T. (2020). Marrubium vulgare L. : A phytochemical and pharmacological overview. *Molecules*, 25(12), 2898.
- Al-Snafi, AE, Al-Saedy, HA, Talab, TA, Majid, WJ, Batiha, GES et Abofazi, JS (2021). Les ingrédients bioactifs et les effets thérapeutiques de Marrubium vulgare-A review. *Archives du Journal international des sciences biologiques et pharmaceutiques*, 1 (2), 9-21.
- Anandharajan, R., Jaiganesh, S., Shankernarayanan, N. P., Viswakarma, R. A., Balakrishnan, A. (2006). *In vitro* glucose uptake activity of *Aegles marmelos* and *Syzygium cumini* by activation of Glu T4, PI3 Kinase and PPAR γ in L6 myotubes. *Phytomedicine*, 13 pp 434-441.
- ARCHAMBAUDM, CLAVED. (2007). FICHE TECHNIQUE : *Enterococcus faecalis*
- Balentine, C. W., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., Duong, D. Q., et Pohlman, F. W. (2006). The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73, pp 413-421.
- Bitwell, C., Indra, S. S., Luke, C., & Kakoma, M. K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, e01585.
- Bonnier G., 1909, La Végétation de la France, Flore Complète. Tome 09. Ed : Suisse et Belgique. Paris. pp. 25-26. In Djahra, A. B. (2014). Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou Marrubium vulgare L. *Thèse de doctorat en science. Université Badji Mokhtar, Annaba. P73p.*
- Boureneb Souad, M. F. M. H. (2023). Evaluation de l'effet antioxydant du Marrubium vulgare chez le rat in vitro.
- Bruneton, J. (2016). *Pharmacognosie : Phytochimie-plantes médicinales*. Tec & Doc.

Références bibliographiques

- Carle, S. (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel*, 42(2), 6-21.
- Cattoir, V. (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie biologique*, 52(10), 607-616.
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). "Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles." *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615-8627.
- Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., & Teissède, P. L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82.
- Chow, SH *Le rôle de la leucocidine de Staphylococcus aureus Panton-Valentine (PVL) dans les macrophages des mammifères* (thèse de doctorat, Université Monash).
- Djahra, A. B. (2014). Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou Marrubium vulgare L. *Thèse de doctorat en science. Université Badji Mokhtar, Annaba. P73p.*
- Djahra, A. B., Bordjiba, O., & Benkherara, S. (2013). Extraction, séparation et activité antibactérienne de tanins de marrube. *Phytothérapie*, 11, 348-352.
- Engemann, J. J., Carmeli, Y., Cosgrove, S. E., Fowler, V. G., Bronstein, M. Z., Trivette, S. L., ... & Kaye, K. S. (2003). Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with Staphylococcus aureus surgical site infection. *Clinical infectious diseases*, 36(5), 592-598.
- Fazeli, M. R., Amin, G., Ahmadian-Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., et Samadi, N. (2007). Antimicrobial activities of Iranian sumac and *Zataria multiflora* against some food-borne bacteria. *Food Control*, 18, pp 646-649.
- Garnier, M. (2020). Bactéries multirésistantes : impact sur le pronostic en réanimation. *Anesthésie & Réanimation*, 6(2), 219-225.
- GHEDADBA, N. (2018). *Contribution à l'étude de l'activité biologique des deux espèces de Marrubium vulgare L et Marrubium deserti de Noé in vitro et in vivo* (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
- Ghedadba, N., Bousselsela, H., Hambaba, L., Benbia, S., & Mouloud, Y. (2014). Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of the leaves and flowered tops of Marrubium vulgare L. *Phytothérapie*, 12, 15-24.).
- Ghedadba, N., Hambaba, L., Aberkane, M. C., Oueld-Mokhtar, S. M., Fercha, N., & Bousselsela, H. (2014). Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de Marrubium vulgare L. *Algerian Journal of Natural Products*, 2(2), 64-74.
- Gourich, A. A., Touijer, H., Drioiche, A., Asbabou, A., Remok, F., Saidi, S., ... & Zair, T. (2023). Insight into biological activities of chemically characterized extract from Marrubium vulgare L. in vitro, in vivo and in silico approaches. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1238346.).

Références bibliographiques

- Grégoire M et Baas P (2013). Une enquête sur les cellules mucilageuses dans les organes
- Güçlü-Üstündağ, Ö., & Mazza, G. (2007). Saponines : propriétés, applications et transformation. *Revue critiques en sciences alimentaires et nutrition*, 47 (3), 231-258.
- Hroboňová, K., Jablonský, M., & Májek, P. (2021). Optimization and application of green solvent extraction of natural bioactive coumarins from Lamiaceae and Asteraceae herbal plants. *Journal of Molecular Liquids*, 338, 116691.
- [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:E._coli_Bacteria_\(7316101966\).jpg?uselang=fr](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:E._coli_Bacteria_(7316101966).jpg?uselang=fr)
- https://fr.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus_r%C3%A9sistant_%C3%A0_la_m%C3%A9ticilline#cite_ref-20
- <https://prevent-and-protect.com/pathogen/proteus-mirabilis-en/>
- Systématique : Une Perspective phylogénétique. 1ere Ed : Paris et Bruxelles. pp. 369-384. in Djahra, A. B. (2014). Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou Marrubium vulgare L. *Thèse de doctorat en science. Université Badji Mokhtar, Annaba. P73p.*
- Leybros, J., & Frémeaux, P. (1990). Extraction solide-liquide. I. Aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*, 2, J2780-1.
- Lorrain, É. (2019). 59. Le marrube blanc. *Les nouveaux chemins de la santé*, 866-876.
- Mariani-Kurkdjian, P., Doit, C., & Bingen, E. (2012). Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu en pédiatrie. *Archives de pédiatrie*, 19, S93-S96.
- Masoodi, M. H., Ahmed, B., Zargar, I. M., Khan, S. A., Khan, S., & Singh, P. (2008). Antibacterial activity of whole plant extract of Marrubium vulgare. *African journal of Biotechnology*, 7(2).
- Menaiaia, K., Khaldi, F., Ouahab, A., & Bensouici, C. (2021). Determination of the bioactive compounds, antioxidant and antifungal activities of different extracts of Marrubium vulgare L. *Annals of Oradea University, Biology Fascicle/Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*, 28(1).
- Muylaert, A., & Mainil, J. G. (2012). Bacterial antimicrobial resistances: the mechanisms and their contagiousness.
- Napoli, E., Siracusa, L., & Ruberto, G. (2020). New tricks for old guys: Recent developments in the chemistry, biochemistry, applications and exploitation of selected species from the Lamiaceae Family. *Chemistry & biodiversity*, 17(3), e1900677.
- Natarajan, D., John Britto, S., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C., et Perumal, G. (2005). Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis* a rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol*, 102, pp 123-126.

Références bibliographiques

- Nawwar, M. A., El-Mousallamy, A. M., Barakat, H. H., Buddrus, J., & Linscheid, M. (1989). Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, 28(11), 3201-3206., et Wolski, T., Matosiuk, D., Baj, T., et Ziewiec, A. (2007). White horehound (*Marrubium vulgare* L.) medicinal plant with multidirectional pharmacological activity. *Post. Fitoterapii*, 8, pp 39-45. In GHEDADBA, N. (2018). *Contribution à l'étude de l'activité biologique des deux espèces de Marrubium vulgare L et Marrubium deserti de Noé in vitro et in vivo* (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
- Patel, S., & Rani, R. (2013). "Extraction of bioactive compounds from plants: An overview." *Pharmacognosy Reviews*, 7(14), 101-107.
- Polese, J. M. (2007). *Encyclopédie visuelle des plantes sauvages(107)*. Editions Artémis.
- Polese, J. M. (2007). *Encyclopédie visuelle des plantes sauvages*. Editions Artémis.
- Raja, RR (2012). Plantes à potentiel médicinal de la famille des Labiatae (Lamiaceae) : An. *Revue de recherche sur les plantes médicinales*, 6 (3), 203-213.
- Singh, B. (Ed.). (2020). *Botanical leads for drug discovery* (pp. 363-387). Springer.
- Tattevin, P. (2011). Les infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) d'acquisition communautaire. *Médecine et maladies infectieuses*, 41(4), 167-175.
- Trivellini, A., Lucchesini, M., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, TSS, Vernieri, P., ... & Pardossi, A. (2016). Les phénols de Lamiaceae comme composés multifacettes : bioactivité, perspectives industrielles et rôle du « stress positif ». *Cultures et produits industriels*, 83, 241-254.
- Van Wyk, BE, & Wink, M. (2018). *Plantes médicinales du monde (pp 215)* . Cabi.
- Vora, S., & Auckenthaler, R. (2009). Que signifie «bêtalactamases à spectre élargi» en pratique. *Rev Med Suisse*, 5, 1991-4.
- Voutquenne-Nazabadioko, L. (2010). Etude chimiotaxonomique de la famille des Sapindaceae. *Ethnopharmacologia*, 45, 49-52. IN Boureneb Souad, M. F. M. H. (2023). Evaluation de l'effet antioxydant du *Marrubium vulgare* chez le rat in vitro.
- Voutquenne-Nazabadioko, L. (2010). Etude chimiotaxonomique de la famille des Sapindaceae. *Ethnopharmacologia*, 45, 49-52. IN Boureneb Souad, M. F. M. H. (2023). Evaluation de l'effet antioxydant du *Marrubium vulgare* chez le rat in vitro.
- Waller, SB, Cleff, MB, Serra, EF, Silva, AL, dos Reis Gomes, A., de Mello, JRB, ... & Meireles, MCA (2017). Plantes de la famille des Lamiacées comme source de molécules antifongiques en médecine humaine et vétérinaire. *Pathogénèse microbienne*, 104, 232-237.

Références bibliographiques

- Weber, E. (2017). *Invasive plant species of the world : a reference guide to environmental weeds*. Cabi.
- Whiteway, C., Breine, A., Philippe, C., & Van der Henst, C. (2022). *Acinetobacter baumannii*. *Trends in microbiology*, 30(2), 199-200.
- ZAHIR, I., HOUARI, A., IRAQUI, M., & IBNSOUDA, S. (2018). Valorisation de l'activité antibactérienne des microorganismes isolés à partir des biotopes marocains et caractérisation partielle de leurs principes actifs. *Proceedings BIOSUNE*, 1-2018.
- Zarai, Z., Kadri, A., Ben Chobba, I., Ben Mansour, R., Bekir, A., Mejdoub, H., & Gharsallah, N. (2011). The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in health and disease*, 10, 1-8.

Annexes

Annexes

Annexe 1

▪ Rendements des extraits avant délipidation

Extrait	Rendement %
Aqueux	12,48
Méthanolique	12,5
Ethanolique	10,37
A dichlorométhane	2,85
A acétate d'éthyle	1,05
A Chloroforme	2,74
A Hexane	2,6

▪ Rendement après délipidation

Extrait	Rendement
Aqueux	11,73
Méthanolique	15,10
Ethanolique	12,60
A déchlorométhane	2,34
A Hexane	0,31
A chloroforme	1,13

Annexe 2

Préparation des dilutions des extraits de plante pour la méthode de diffusion de disque

A _ Préparation de la solution mère (50mg /ml)

Dans un tube contient 200mg de l'extrait, ajouter 4ml d'eau distillé stérile, mélanger la solution bien à l'aide d'un vortex pour obtenir une solution homogène.

b _ Préparation de solution (20mg / ml)

Pour obtenir une concentration de 20mg /ml, prendre 2ml à partir de SM, et la mélanger avec 2ml d'eau distillé stérile, homogénéiser la solution à l'aide d'un vortex.

Annexes

c _Préparation de solution (10mg /ml)

Prendre 2ml à partir de la solution précédente et la mélanger avec 2ml d'eau distillé stérile, mélanger la solution par un vortex.