



Licence Sciences et Techniques (LST)

Technique d'Analyse et Contrôle de Qualité

« TACQ »

## PROJET DE FIN D'ETUDES

Etude phytochimique d'une plante médicinale

« Marrubium Vulgare L. »

Présenté par

SGHIRI FATIMA ZAHRAE

Encadré par :

Pr. CHABIR RACHIDA (FMP, FES)

Pr. EL OUAZZANI CHAHDI FOUAD (FST)

Soutenu, Le 05/07/2022 devant le jury composé de:

-Pr. EL ASRI MOHAMMED

-Pr. BOULHANA AHMED

-Pr. OUAZZANI CHAHDI FOUAD

Stage effectué à : LABORATOIRE DE PHYSIOPATHOLOGIE ET NUTRITION

FMP FES

Année Universitaire 2021 / 2022

## Résumé

Ce travail porte sur une étude phytochimique des différentes préparations, et une recherche d'effet anti-inflammatoire de la partie aérienne de marrube blanc « *Marrubium Vulgare* ».

*Marrubium Vulgare*, famille Lamiacées, est une plante herbacée vivace, très répandue dans les régions riches en azote.

Les tests ont révélés les différents rendements, liés aux différentes méthodes d'extraction d'alcaloïdes et des saponines.

De même, les résultats obtenus d'effet d'extrait aqueux de saponine, et d'alcaloïde sur l'inflammation créée par le formol au niveau de la patte des poussins, permet de confirmer le caractère anti-inflammatoire de cette plante.

## Abstract:

This work concerns a phytochemical study of the different preparations and a search for the anti-inflammatory effect of the aerial part of white horehound "*Marrubium Vulgare*".

*Marrubium Vulgare*, family of lamiaceae, is a perennial herbaceous plant, very popular in region rich in nitrogen.

The tests revealed the different yields linked to the different methods of extraction of alkaloids and saponins.

Similarly, the results obtained from the effect of aqueous extract of saponins and alkaloid, on the inflammation caused by formaldehyde in the paws of chicks, confirms the anti-inflammatory nature of this plant.

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*A ma très chère mère source de tendresse*

*A mon très cher père, qui m'encourage dans*

*Les instants délicats*

*A mes chers frères et sœurs, et à toute ma famille*

*A mes chers amis : SOUMAYA, KHADIJA, HAJAR*

*Et à tous mes collègues de la promotion TACQ 2021-2022*

# Remerciements

*Nous remercions DIEU qui nous donné la force et la patience pour*

*Terminer ce travail*

*Nous exprimons nos sincères remerciements :*

*A nos parents pour leur contribution pour chaque travail que nous vous effectué*

*J'adresse mes remerciements à mon professeur Mr OUAZZANI CHAHDI FOUAD de la FST Fès*

*Je voudrai témoigner de mes remerciements et mes gratitude à mon professeure de stage*

*Mme CHIBIR RACHIDA*

*pour son accueil, sa disponibilité, le partage de son expertise au quotidien*

*Je tiens à remercier très sincèrement le professeur Mr ERRACHIDI FAOUZI pour leur*

*Soutiens*

*Nos vifs remerciements vont aux membres du jury ; pour leurs acceptation d'examiner ce travail.*

*Veillez trouvez, ici l'expression de mon reconnaissance et mon respect*

*Je remercie également toute l'équipe de travail pour leur accueil ; leur esprit d'équipe en particulier*

*OURLAGLI TAHA, et ABDELLEATIF AMNAY qui ont m'aider beaucoup à comprendre beaucoup*

*d'astuces au laboratoire.*

*En fin ; je tiens à remercier ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de*

*ce travail.*

## *Liste des figures*

<b>Figure</b> : Aperçu photographique du Marrubium Vulgare .....	4
<b>Figure2</b> : Extraction par appareil soxhlet .....	9
<b>Figure 3</b> : Extraction par reflux .....	10
<b>Figure4</b> : Aperçu photographique d'un lot d'élevage.....	14
<b>Figure5</b> : les solutions utilisées durant la manipulation .....	14
<b>Figure 6</b> : Aperçu photographique d'un pied à coulisse.....	16
<b>Figure 7</b> : la patte avant injection du formole .....	17
<b>Figure 8</b> : la patte après injection du formole .....	17
<b>Figure9</b> : alcaloïdes par Soxhlet.....	19
<b>Figure10</b> : alcaloïdes par macération .....	19
<b>Figure11</b> : saponines par macération.....	19
<b>Figure12</b> : présentation graphique de % INH des solutions selon la dose .....	22
<b>Figure13</b> : présentation graphique du % INH en fonction du temps,dose de 300mg/kg.....	23
<b>Figure14</b> : présentation graphique du % INH en fonction du temps, dose de 500mg/kg.....	23

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1</b> : la variation du poids des poussins en fonction du jour .....	13
<b>Tableau 2</b> : résultats de poussin de Lot AS <sub>3</sub> .....	20
<b>Tableau 3</b> : résultats de poussin de Lot AS <sub>5</sub> .....	20
<b>Tableau 4</b> : résultats de poussin de Lot AM <sub>3</sub> .....	20
<b>Tableau 5</b> : résultats de poussin de Lot AM <sub>5</sub> .....	21
<b>Tableau 6</b> : résultats de poussin de Lot SM <sub>3</sub> .....	21
<b>Tableau 7</b> : résultats de poussin de Lot SM <sub>5</sub> .....	21
<b>Tableau 8</b> : résultats de poussin de Lot A .....	21
<b>Tableau 9</b> : résultats de poussin de Lot T .....	22

# TABLE DE MATIÈRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
1. Les plantes médicinales .....	2
1.1. Contrôle des plantes médicinales .....	2
i. Contrôle d'identification .....	2
i. Contrôle de qualité .....	3
2. Marrubium Vulgare L.....	4
i. Systématique .....	4
ii. Composition chimique .....	4
3. Autres caractéristiques .....	6
<b>A. TOXICITE</b> .....	6
<b>B. EFFETS SECONDAIRES ET CONTRE-INDICATION DE MARRUBIUM VULGARE</b> .....	6
<b>C. USAGE</b> .....	6
d. En cosmétique .....	6
1. Méthodes d'extraction des alcaloïdes contenus dans le Marrubium vulgare : .....	8
2. Méthodes d'extraction des saponines contenus dans le Marrubium vulgare : .....	11
3. Le caractère anti-inflammatoire du Marrube : .....	13
1. Séchage et broyage : .....	18
2. Calcul des rendements d'extraction : .....	18
a. Extraction par <b>Soxhlet</b> : .....	18
c. Extraction par macération : .....	18
3. Le caractère anti-inflammatoire : .....	20
a. 3.1.Lot AS <sub>3</sub> : .....	20
b. Lot AS <sub>5</sub> : .....	20
c. Lot AM <sub>3</sub> : .....	20
d. Lot AM <sub>5</sub> : .....	20
e. Lot SM <sub>3</sub> : .....	21
f. Lot SM <sub>5</sub> : .....	21
g. Lot A : .....	21
h. Lot T : .....	22
4. Discussion : .....	22
a. L'effet de ladose : .....	22

b. Effet des solutions à une dose de 300mg/kg par rapport à la solution d'Aspirine :.....	23
c. Effet des solutions à une dose de 500mg/Kg par rapport à l'Aspirine :.....	23
Conclusion générale .....	24
Références .....	25



## INTRODUCTION GENERALE

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est une pratique courante depuis des millénaires, ce phénomène a un regain d'intérêt avec les premières recherches sur les propriétés antimicrobiennes des plantes utilisées en médecine traditionnelle, donnant une base scientifique à ces pratiques empiriques [1].

Le médicament à base de plante est un « complexe » de molécules, issu d'une ou plusieurs espèces Végétales. De nombreuses formes galéniques sont aujourd'hui proposées, certaines plus innovantes que d'autres, laissant l'infusion originelle plus ou moins désuète. Pourtant ces changements de forme peuvent parfois cacher des modifications quant à l'action sur le métabolisme ou la biodisponibilité des principes actifs [2].

Pour notre part, notre choix s'est focalisé sur les Lamiacées, étant une famille regroupant la plupart des Plantes aromatiques et condimentaires de la région méditerranéenne. Notre étude cible la plante nommée « *Marrubium Vulgare* » qui est riche essentiellement en composés phénoliques et employés traditionnellement en médecine.

Elle possède des activités toniques, aromatiques, stimulantes, expectantes, diaphorétiques et diurétiques, cette plante est également connue par nos ancêtres pour ces effets antioxydant et antimicrobien. [3]

Ce document est constitué de trois parties, la première est la partie bibliographique qui consiste sur les plantes médicinales sous titre d'exemple « *Marrubium Vulgare L.* ».

La seconde concerne les techniques expérimentales appliquées au laboratoire. Et la troisième pour les résultats et discussions, de ce qui en relation avec les différentes méthodes d'extraction des alcaloïdes et des saponines contenus dans « *Marrubium Vulgare* », et aussi de caractère anti-inflammatoire de ces solutions aqueux, appliquer sur des poussins à des doses différentes.

# Etude Bibliographique

## 1. Les plantes médicinales

D'après la 10<sup>ième</sup> édition de la Pharmacopée Française, les plantes médicinales sont des drogues végétales au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Ces plantes peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires, ou hygiéniques [4]. Dans ce rapport, on se base sur l'étude d'une plante médicinale appartenant à la famille des Lamiacée, nommée « *Marrubium Vulgare L.* ».

### 1.1. Contrôle des plantes médicinales

C'est l'une des étapes les plus importantes de la pharmacognosie moderne. Le contrôle des matières premières utilise des techniques de botanique, de chimie analytique, ou encore de la physiologie [5], il est nécessaire d'après le Code de la Santé Publique (CSP) et repose sur plusieurs étapes. La nécessité est due au fait que différents lots de plantes médicinales n'auront pas la même qualité. Les facteurs en cause sont nombreux : le cycle végétatif, les conditions climatiques et météorologiques, ou encore les conditions de récolte et de stockage des plantes. [6]

L'existence de « races chimiques » au niveau des végétaux leur confère une teneur en principes actifs spécifique, liée au caractère héréditaire. Ceux-ci peuvent être déséquilibrés dans leur nature ou leur proportion.

#### i. Contrôle d'identification

Le but d'identification de la drogue consiste à s'assurer qu'il n'y a pas d'erreur commise ou de falsification de la plante, involontaire ou non.

- **Contrôle botanique :**

Il doit effectuer sur deux plans : macroscopique à l'aide des caractères organoleptiques de la plante, et microscopique. Une fois identifié, le végétal est dénommé à l'aide de la nomenclature universelle avec son système binomial et en latin. Le contrôle organoleptique s'effectue à l'échelle humaine principalement à l'aide de certains sens dont est doté l'être humain : la vue, l'odorat, le goût et le toucher. Il doit être suivi pour éviter toute erreur possible, du contrôle microscopique. Certaines plantes présentent de fortes ressemblances

morphologiques, il est donc possible de ramener. Principalement lors de la cueillette, un individu présentant des propriétés complètement différentes de celles recherchées, voire parfois toxique. [6].

- **Contrôle chimique :**

Il permet de définir l'activité de la plante. Plusieurs possibilités de contrôle sont envisageables. Les premières sont les réactions chimiques d'identité, elles se réalisent facilement et rapidement sur des

constituants présents en quantité importante. Leur but est d'apparaître une coloration ou une précipitation qui sera alors spécifique de certaines classes de substances chimiques : alcaloïdes, flavonoïdes, coumarines, saponosides... ensuite se placent les analyses chromatographiques. Les pharmacopées exigent le recours à diverses techniques chromatographiques afin de garantir l'identité et la qualité pharmaceutique d'une drogue. Ce sont des techniques de séparation des constituants ; les méthodes existantes sont de plusieurs ordres : La chromatographie sur couche mince, en phase gazeuse, et en phase liquide à haute performance [7].

- i. Contrôle de qualité

Afin de tirer la meilleure partie des plantes médicinales, il convient de veiller à ce que les herbes et leurs dérivés soient d'excellente qualité et purs. Cela exige qu'elles soient cultivées dans de bonnes conditions, correctement séchées, bien conservées, date limite de conservation respectée. Un produit d'une qualité optimale aura forcément une efficacité maximale. Plusieurs raisons peuvent se trouver à l'origine amoindrie : la récolte de la plante peut avoir été mal réalisée, la drogue pas suffisamment séchée ou stockée non convenablement, ou enfin des herbes âgées ou détériorées ont été employées. [7]

Les spécifications de la pharmacopée doivent être suivies, sur plusieurs échantillons d'un lot. Pour tous les lots, plusieurs techniques s'utilisent afin d'assurer la délivrance du produit dans les meilleures conditions. Parmi les techniques d'analyses utilisées pour contrôler la qualité du produit, on trouve :

- Dosages
- Teneur en eau et perte à la dessiccation
- Taux de cendres
- Recherche d'éléments étrangers
- Recherche des métaux lourds
- Recherche de contamination microbienne
- Recherche de radioactivité

- Recherche de substances toxiques étrangères [7]

## 2. Marrubium Vulgare L.



**Figure1** : Aperçu photographique du Marrubium Vulgare.

Le *Marrubium Vulgare L.* est une plante médicinale herbacée vivace pouvant atteindre 80cm de hauteur à tige quadrangulaire cotonneuse, les feuilles ovales et arrondies et les fleurs petites et blanches. Toute la plante dégage une odeur forte, sa saveur est acre (qui irrite les organes du goût et de l'odorat) et amère.

Les milieux préférés de *Marrubium Vulgare L.* sont les sols calcaires d'Europe centrale et du nord ; aussi dans les sols riches en azote (nitrates), ou déchets organiques à minéralisation rapide. [8]

### i. Systématique

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous Embranchement : Angiospermes
- Classe : Eudicots
- Sous Classe : Eunastéridés I
- Ordre : Lamiacées
- Genre espèce : *Marrubium Vulgare L.*
- Nom vulgaire : Marrube [9].

### ii. Composition chimique

Le *Marrubium Vulgare L.* contient un principe amer (Marrubine à 0,3%), de la choline (0,2%), des hétérosides, des traces d'une huiles essentielle (0,05%), un tannin (2,6 à 2,9%), une cire contenant des stérols, beaucoup de nitrates et de fer [10]. Elle possède également des

lactones di-terpéniques que : la marrubiine, prémarubiine, pérégrinol, vulgatoI, marrubénol, marrubiol... Le *Marrubium Vulgare L.* contient en outre, des minéraux tels que le potassium et surtout beaucoup de Fer. Elle présente pareillement un certain taux de composés azotés caractéristiques de sa famille tel que : choline, stachydrine, bétonicine.... [8].

### 2.1.1 LES ALCALOÏDES

Les alcaloïdes sont des substances basiques, contenant un atome ou plus d'azote généralement inclus dans un système hétérocyclique. On distingue : les alcaloïdes sels et les alcaloïdes bases [11]. Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine. Elles sont utilisées comme anti-cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) [12].

### 2.1.2 Les saponines

Ce sont des substances hétérosidiques à propriétés tensioactives ; selon la nature de la génine, On distingue deux groupes : les saponosides à gémme stéroïdique et les saponosides à gémme triterpéniques [11].

### 2.1.3 Les polyphénols

Les polyphénols sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette application générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement [13]. Ces composées ont tous en commun par la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie de molécules simples (acide

phénolique simple) aux molécules hautement polymérisées (tannins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées [14].

## 2.2 Propriétés et vertus

### • Principalement :

Les lactones di-terpéniques sont mucolytiques et expectorantes, avec un tropisme respiratoire (saveur amère). D'où leur action de fluidification des sécrétions bronchiques, de facilitation de l'expectoration, d'antitussif, et de dilatation des bronches. La betonicine est un inhibiteur des molécules de signalisation des bactéries (Quorum-Sensing Inhibitor), qui permettent la

transmission de la résistance entre bactéries, c'est donc un excellent adjuvant aux traitements anti-infectieux. [8]

- **Secondairement :**

- Cardiotonique
- Cholagogue
- Désinfectant
- Diurétique
- Emménagogue
- Fébrifuge
- Stomachique
- Tonique [8]

### **3. Autres caractéristiques**

#### **a. TOXICITÉ**

C'est une plante amère à caractère salin et ne peut pas être toléré s'il y'a une gastroentérite ou des situations de nausées ou encore en cas de dyspepsie. [15]

#### **b. EFFETS SECONDAIRES ET CONTRE-INDICATION DE MARRUBIUM VULGARE**

Aucun effet toxique n'a été signalé pour l'instant à la dose thérapeutique. En revanche à des doses excessivement élevée [16]. Le *Marrubium Vulgare* pourrait provoquer des troubles du rythme cardiaque ; La commission E Allemande déconseille aux femmes enceintes d'utiliser le marrube, car cette plante stimule l'utérus et aurait un effet abortif [17].

#### **c. USAGE**

La racine de la plante est largement utilisée ; l'écorce des racines trouve encore quelques emplois en médecine traditionnelle maghrébine, pour traiter la stérilité féminine, les douleurs rhumatismales, les entorses et surtout pour les maladies pulmonaires graves. [18]

#### **d. En cosmétique**

La plante est utilisée en cosmétologie traditionnelle pour sa richesse en saponines, la décoction en rinçage sur les cheveux, les embellis et les cataplasmes de la plante opposés sur les taches de rousseur et les éclaircit [19].

#### **3.1.1 En médecine**

- **Action contre la fièvre :**

De nos jours les recherches sur son action contre la fièvre typhoïde ont montré que la plante avait le pouvoir de faire baisser la fièvre tout en améliorant l'état général et en abrégant la

maladie. La présence d'une substance antibiotique est possible. La plante hachée est couramment utilisée en cataplasme sur le front et les tempes contre la fièvre [19]. De plus l'infusion chaude aide à faire baisser la fièvre [20].

- **Action contre l'arythmie :**

Certains constituants du *Marrubium Vulgare* ont une action régulatrice sur les muscles cardiaque. La plante est ainsi un très bon remède de l'arythmie (extrasystolique) qui, par son usage, cède toujours de façon plus ou moins rapide et plus ou moins complète [20].

- **Action contre la bronchite :**

Les vertus du marrube sont les plus intéressantes en pratique courante et ce sont elles qui méritent ici le plus de place. Depuis un temps immémorial, on prescrit cette plante dans les affections des voies respiratoires et les praticiens contemporains ont rendu justice aux vieux expérimentateurs dont le champ était souvent le seul laboratoire. Dans la bronchite et la trachéite [20].

- **Action contre la toux rebelle et l'asthme humide :**

Le *Marrubium Vulgare* donne d'excellents résultats pour le traitement de la toux rebelle, l'asthme humide et, comme expectorant, dans la tuberculose pulmonaire (où il intervient aussi comme tonique). Il a des effets fluidifiants et antiseptiques sur les sécrétions bronchiques, et il facilite leur évacuation [20]. En plus les feuilles du marrube blanc sont utilisées comme des toniques expectorants et antiseptiques pour la toux [19].

- **Action contre la malaria :**

Le marrube blanc est proposé aussi contre la malaria [20].

- **Action contre les maux des dents :**

Le marrube est mâché contre les maux de dents [19].

# Matériels et Méthodes

## **1. Méthodes d'extraction des alcaloïdes contenus dans le Marrubium vulgare :**

### **1.1. Matériels biologique :**

Pendant notre étude nous avons utilisé la plante médicinale « *Marrubium Vulgare* » comme matériels biologique.

### **1.2. Séchage et broyage :**

L'élimination des impuretés et des poussières, est une étape obligatoire avant de détacher les feuilles des tiges, suivie par le séchage, puis le broyage par un broyeur électrique et on obtient une poudre fine facile à utiliser pour extraire les alcaloïdes et les saponines qu'elle contienne par des différentes méthodes.

### **1.3 Taux d'humidité de la matière sèche:**

Le taux d'humidité d'un échantillon de matériel végétal est définit par le rapport de quantité de poids perdu pendant le séchage sur son poids initial, le résultat est multiplier par 100. A partir de la teneur en humidité, le taux de matière sèche est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de matière sèche (\%)} = 100 - \text{Taux d'humidité (\%)}$$

### **1.4 Extraction des alcaloïdes par soxhlet :**

#### **Principe :**

Une méthode d'extraction par un solvant organique polaire sera appliquée, le principe consiste à éliminer les impuretés contenant dans chaque phase (organique et aqueuse), par déplacement des alcaloïdes par acidification (vers la phase aqueuse) et par alcalinisation (vers la phase organique), jusqu'à l'obtention d'un résidu pâteux présentant les alcaloïdes totaux.



### Mode opératoire :

Une quantité de 20g de poudre a été extraite par 300ml d'éthanol absolu par un extracteur de « Soxhlet », jusqu'à ce que la solution dans le tube siphon devienne transparente.

L'extrait éthanolique a été évaporé jusqu'à siccité à 60°C. Le résidu sec a été repris avec 40 ml de chloroforme, puis acidifiée par une solution HCl 5% Jusqu'à pH = 3. Après ne période d'une demi-heure à température ambiante, la phase aqueuse acide a été extrait avec 40ml chloroforme, et alcalinisé par NaHCO<sub>3</sub> 5% jusqu'à pH = 9. La phase chloroformique a été évaporée à 40°C et le résidu final qui reste représente les alcaloïdes totaux.



**Figure2** : Extraction par appareil soxhlet

## 1.5 Extraction des alcaloïdes par reflux :

### Principe :

L'extraction des alcaloïdes totaux par reflux a été réalisée selon la méthode de **(Koné, D.2009)**, dont le protocole est considéré comme une série de purification des alcaloïdes d'autres métabolites secondaires pouvant présenter dans la solution extractive initiale.

La purification consiste à faire passer les alcaloïdes de la phase organique à la phase aqueuse par acidification et inversement de la phase aqueuse à la phase organique par alcalinisation. On élimine ainsi l'impureté soluble dans les solvants organiques (lipides, résine, chlorophylle) et les impuretés hydrosolubles (sucre, sels minéraux et organiques).

**Mode opératoire :**

20g de poudre a été mise en reflux avec 100ml de méthanol pendant 12h. Par la suite le contenu a été filtré, et le filtrat a été envoyé au rotavapeur afin d'obtenir un résiduel sec contenant les alcaloïdes et autres impuretés. Le résidu a été traité par 40ml de chloroforme, placé dans une ampoule à décanter et lavé 4 fois par une solution d'acide acétique 5<sup>0</sup>/. La phase aqueuse obtenue a été alcalinisée par quelques gouttes de NaOH 10<sup>0</sup>/ et traité par 40ml de chloroforme. Le contenu a été placé à nouveau dans une ampoule à décanter, la phase organique a été récupérée.

En suite la solution obtenue a été concentrée à l'aide d'une rotavapeur, un résiduel pâteux contenant les alcaloïdes totaux a été obtenu.



**Figure 3:** Extraction par reflux

## 1.6 Extraction des alcaloïdes par macération :

### Principe :

L'extraction des alcaloïdes totaux par macération consiste à un épuisement des alcaloïdes par une solution alcoolique acidifiée.

L'étape de purification est assurée par alcalinisation en utilisant une base concentrés, et une filtration dans ne ampoule à décanter. Le résidu précipité représente les alcaloïdes totaux.

### Mode opératoire :

250ml de l'acide chlorhydrique à 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> et 110ml d'acétate d'éthyle ont été ajouté à 5g de poudre dégraissée de matières grasses, le tout a été conservé à 4°C pendant 10 heures.

Ensuite, le mélange a été filtré et la solution extractive contenant les alcaloïdes sous forme sels + impuretés a été récupérée, le milieu réactionnel a été alcalinisé par quelques gouttes de NaOH 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> jusqu'au pH =8. Le mélange par la suite a été décanté par 50ml d'acétate d'éthyle pour chacune, et la phase aqueuse a été débarrasser par une pincée de sulfate de sodium.

Enfin la phase organique a été évaporée à l'aide d'n rotavapeur, et un résidu précipité représente les alcaloïdes totaux a été obtenue.

## **2. Méthodes d'extraction des saponines contenus dans le Marrubium vulgare :**

### **2.1 Extraction des saponines par soxhlet :**

#### Principe :

C'est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. L'échantillon entre rapidement en contact avec une portion de solvant organique polaire comme le méthanol pour l'extraction des métabolites secondaires, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. De plus, elle ne nécessite pas de filtration après extraction et peut être utilisée quel que soit la

matrice végétale, un solvant spécifique pour les saponines comme le n-butanol a été utilisé pour l'isolement.

### **Mode opératoire :**

20g de poudre de *Marrubium Vulgare*, sont introduits dans un coton cartouche de cellulose, puis extrait avec 300ml de méthanol (qualité analytique de 99 %) en utilisant un appareil soxhlet pendant 24h.

La solution récupérée sera filtrée à travers un papier filtre. [21]

La solution extractive sera évaporée afin d'obtenir l'extrait sec. L'extraction de la phase organique sera réalisée à l'aide de 100ml de solution n-butanol/H<sub>2</sub>O (50/50) pendant 30min.

Puis concentrée à l'aide d'un évaporateur dans un bain à une température de 69°C sous une pression de 800 mbar avec une vitesse de rotation de 120 r/min, l'extrait obtenu est stocké à 4°C jusqu'à ce que les utilisations [22].

## 2.2 Extraction des saponines par macération:

### **Principe :**

L'extrait éthanolique des feuilles de *Marrubium Vulgare*, sera évaporé à sec et partitionné entre le n-butanol et H<sub>2</sub>O, fournissant ainsi un total brut de saponines.

### **Mode opératoire :**

40g de poudre de *Marrubium Vulgare*, sera extrait avec 600ml d'éthanol absolu par macération pendant 48h.

L'extrait sera filtré à travers un papier filtre, la solution extractive sera évaporée afin d'obtenir l'extrait sec.

L'extraction de la phase organique sera réalisée à l'aide de 80ml de solution H<sub>2</sub>O/n-butanol, puis concentrée à l'aide d'un évaporateur dans un bain à une température de 60°C sous une pression de 800 mbar [23].

### 3. Le caractère anti-inflammatoire du Marrube :

Pour effectuer le teste d'anti-inflammatoire des extraits aqueux des alcaloïdes, et des Saponines du « *Marrubium Vulgare* », que l'on applique sur des petits poussins, on procède d'abord par une étape d'élevage.

#### 3.1 Etape d'élevage :

Le choix d'appliquer le protocole de vérification du taux de caractère anti-inflammatoire de la plante médicinale « *Marrubium Vulgare* » sur des petits poussins, nécessite une étape d'élevage pendant 12 jours.

Cette étape est caractérisée par des conditions précise sont les suivants :

- ❖ **Lieu de l'étude** : L'animalerie de la FST.
- ❖ **Température** : entre 28 – 31°C.
- ❖ **La densité** : 10 poussins.
- ❖ **La souche des poussins** : ROSS 308.
- ❖ **Taux de mortalité** =0.
- ❖ **L'alimentation** : 500g dans les trois premiers jours, et 700g pendant le reste.

Aussi on a suivie la variation du poids des poussins (en g) durant cette étape comme le montre le tableau suivant :

**Tableau 1** : la variation du poids des poussins en fonction du jour.

	20/05/2022	22/05/2022	24/05/2022	26/05/2022	28/05/2022
P1	47	85	140	228	272
P2	53,1	87,8	130	224	274
P3	59,2	79	134	226	298
P4	56	77,6	108	250	232
P5	58,3	76	142	194	276
P6	58	66	122	186	288
P7	54,5	81	128	244	228
P8	50	88	116	218	246
P9	62	77,7	120	208	272
P10	57,7	74	126	230	260



**Figure4** : Aperçu photographique d'un lot d'élevage

### **3.2 Préparation des solutions :**

Les solutions préparées à partir des extraits des poudres de saponines, et d'alcaloïdes par des méthodes différentes à une concentration de 2,5% :

- 10ml d'une solution aqueux d'alcaloïde par la méthode soxhlet.
- 10ml d'une solution aqueux d'alcaloïde par la méthode Macération.
- 10ml d'une solution aqueux des saponines par la méthode Macération.
- 10ml d'une solution aqueux d'aspirine.
- 10ml d'eau physiologique (0,9g de NaCl / 100ml d'eau distillé).



**Figure5** : les solutions utilisées durant la manipulation

### 3.3 Le protocole :

Pour chaque poussin, le volume initial ( $V_0$ ) de la patte gauche à été mesuré à l'aide d'un pied A coulisse, avant l'administration des traitements. Les différents traitements en été administré par gavage :

**Lot T** : eau physiologique en raison de 10ml /kg comme témoin.

**Lot AS<sub>3</sub>** : solution d'extrait aqueux d'alcaloïde par méthode Soxhlet, à la dose de  
300mg /Kg.

**Lot AS<sub>5</sub>** : solution d'extrait aqueux d'alcaloïde par méthode Soxhlet, à la dose de  
500mg/Kg.

**Lot AM<sub>3</sub>** : solution d'extrait aqueux d'alcaloïde par méthode macération, à la dose de  
300mg/Kg.

**Lot AM<sub>5</sub>** : solution d'extrait aqueux d'alcaloïde par méthode macération, à la dose de  
500mg/Kg.

**Lot SM<sub>3</sub>** : solution d'extrait aqueux des saponines par méthode macération, à la dose de  
300mg /Kg.

**Lot SM<sub>5</sub>** : solution d'extrait aqueux des saponines par méthode macération, à la dose de  
500mg /Kg.

**Lot A** : solution d'extrait aqueux d'Aspirine à la dose 150mg /Kg.

Trente minutes après l'administration orale des différentes solutions, chaque poussin a reçu une injection de 50µl de solution de formole à 2,5° dans la patte gauche.

Les volumes des pattes injectées ont été mesurés 60, 180 minutes après injection.

L'importance du processus a été appréciée par la détermination d'augmentation (%AUG) du volume de la patte de poussin suivant la formule :

$$\%AUG = [(V_t - V_0) / V_0] \times 100$$

$V_t$  : volume de la patte au temps t.

$V_0$  : volume initial de la patte.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par le calcul du pourcentage d'inhibition (%INH)  
Selon la formule :

$$\%INH = [(\%AUG_{\text{témoin}} - \%AUG_{\text{traité}}) / \%AUG_{\text{témoin}}] \times 100$$



**Figure 6 :** Aperçu photographique d'un pied à coulisse





**Figure 7 :**

la patte avant injection du formole



**Figure 8 :**

la patte après injection du formole

# Résultats et Discussion

## 1. Séchage et broyage :

Pour la détermination du taux de la matière sèche, il faut d'abord calculer le taux d'humidité.

$$\begin{aligned} T &= (P_{\text{final}} / P_{\text{initial}}) \times 100 \\ &= (118/545,4) \times 100 \\ &= 21,61\% \end{aligned}$$

Donc :

$$\text{Taux de la matière sèche} = 100 - 21,61 = 78,38\%$$

## 2. Calcul des rendements d'extraction :

a. Extraction par Soxhlet :

P<sub>S</sub> : poids de l'extrait sec = 1,9147g

P<sub>R</sub> : poids de la poudre = 20g

$$R = 9,57\%$$

b. **Extraction par reflux :**

P<sub>S</sub> : poids de l'extrait sec = 0,6726g

P<sub>R</sub> : poids de la poudre = 20g

$$R = 0,20\%$$

c. Extraction par macération :

P<sub>S</sub> : poids de l'extrait sec = 1,9626g

P<sub>R</sub> : poids de la poudre = 20g

$$R = 9,81\%$$

Ces méthodes d'extraction, plus qu'elles se différencient par leurs protocoles, elles se différencient aussi par leurs rendements.

Les résultats montre que les méthodes d'extraction par Soxhlet, et par macération donnent des rendement beaucoup plus important que la méthode d'extraction par reflux.

Alors que le but recherché c'est d'avoir plus de rendement, donc c'est mieux d'utiliser ces deux méthodes ; Soxhlet et macération ; au lieu d'utiliser la troisième (par reflux).



**Figure9** : alcaloïdes par Soxhlet.



**Figure10** : alcaloïdes par macération.



**Figure11** : saponines par macération.

### 3. Le caractère anti-inflammatoire :

a. 3.1.Lot AS<sub>3</sub> :

La solution préparée par l'extrait aqueux d'alcaloïde par la méthode « Soxhlet ».

✓ Dose de 300mg/kg : V<sub>0</sub>= 7,07mm.

(avec V<sub>0</sub> : volume de la patte avant l'injection de formole ).

**Tableau 2:** résultats de poussin de Lot AS<sub>3</sub>.

temps	volume (mm)	°/°AUG	°/°INH
60min	11,62	64,35	14,58
180min	10,53	48,94	48,18

b. Lot AS<sub>5</sub> :

La solution préparée par l'extrait aqueux d'alcaloïde par la méthode « Soxhlet ».

✓ Dose de 500mg/kg : V<sub>0</sub>= 6,16mm.

**Tableau3 :** résultats de poussin de Lot AS<sub>5</sub>.

temps	volume (mm)	°/°AUG	°/°INH
60min	8,77	42,37	43,75
180min	7,44	20,78	77,99

c. Lot AM<sub>3</sub> :

La solution préparée par l'extrait aqueux d'alcaloïde par « macération ».

✓ Dose de 300mg /kg : V<sub>0</sub>= 6,41mm.

**Tableau4 :** résultats de poussin de Lot AM<sub>3</sub>.

temps	volume (mm)	°/°AUG	°/°INH
60min	11,84	69,1	8,26
180min	11,23	59,59	36,91

d. Lot AM<sub>5</sub> :

La solution préparée par l'extrait aqueux d'alcaloïde par « macération ».

✓ Dose de 500mg/kg :  $V_0 = 7,27\text{mm}$ .

**Tableau 5** : résultats de poussin de Lot AM<sub>5</sub>.

temps	volume (mm)	°/°AUG	°/°INH
60min	9,94	36,73	51,24
180min	9,37	28,89	69,41

e. Lot SM<sub>3</sub> :

La solution préparée par l'extrait aqueux des saponines par « macération ».

✓ Dose de 300mg/kg :  $V_0 = 9,57\text{mm}$ .

**Tableau 6** : résultats de poussin de Lot SM<sub>3</sub>.

temps	volume (mm)	°/°AUG	°/°INH
60min	11,4	19,12	74,62
180min	11,02	15,15	83,96

f. Lot SM<sub>5</sub> :

La solution préparée par l'extrait aqueux des saponines par « macération ».

✓ Dose de 500mg/kg :  $V_0 = 9,26\text{mm}$ .

**Tableau 7** : résultats de poussin de Lot SM<sub>5</sub>.

temps	volume (mm)	°/°AUG	°/°INH
60min	10,65	15,01	80,07
180min	9,56	3,24	96,57

g. Lot A :

La solution aqueux préparée par l'Aspirine.

✓ Dose de 150mg/kg :  $V_0 = 6,54\text{mm}$ .

**Tableau 8** : résultats de poussin de Lot A.

temps	volume (mm)	°/°AUG	°/°INH
60min	9,89	51,22	32
180min	9,1	39,14	58,56

h. Lot T :

L'eau physiologique .

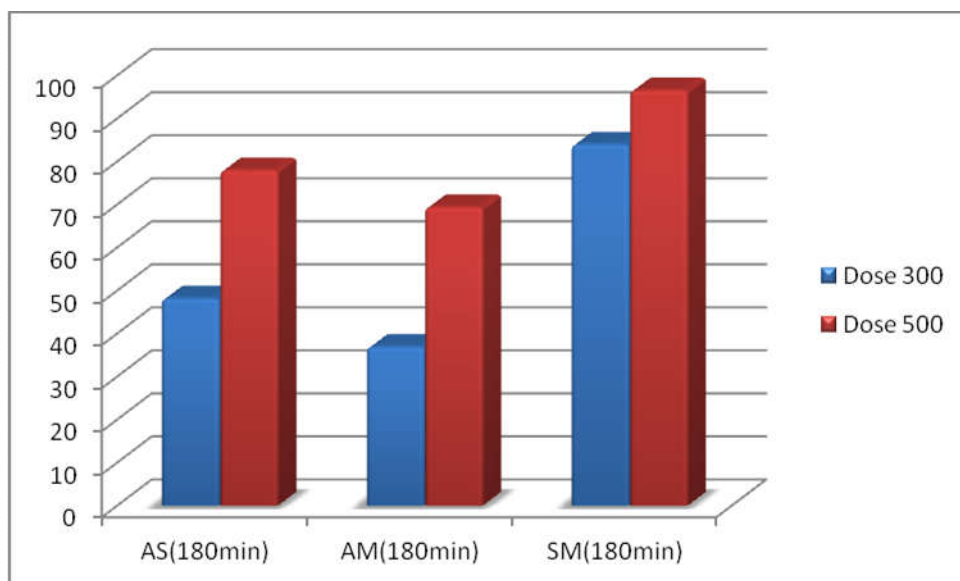
$V_0 = 6,85\text{mm}$ .

**Tableau 9** : résultats de poussin de Lot T.

temps	volume (mm)	°/°AUG	°/°INH
60min	12,01	75,33	-
180min	13,32	94,45	-

## 4. Discussion :

a. L'effet de ladose :



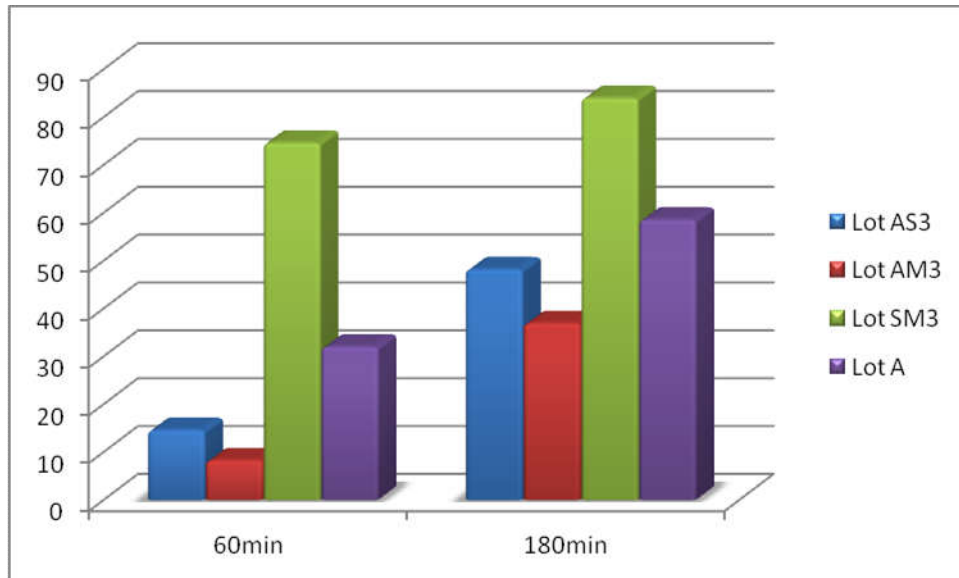
**Figure12** : présentation graphique de % INH des solutions selon la dose.

Nos études statistiques est rassemblées dans la figure ci-dessus, et qui montre la variation des pourcentages d'inhibition(% INH) ; selon la dose des solutions préparés à partir des extraits et qui est reçus par les petits poussins.

La figure montre des valeurs très élevés liés à la dose de 500mg/kg, et des valeurs moins importantes liés à la dose de 300mg/kg.

- **La dose de 500mg/kg plus efficace que la dose de 300mg/kg.**
- **La solution des saponines plus efficace par rapport à la solution des alcaloïdes.**

b. Effet des solutions à une dose de 300mg/kg par rapport à la solution d'Aspirine :



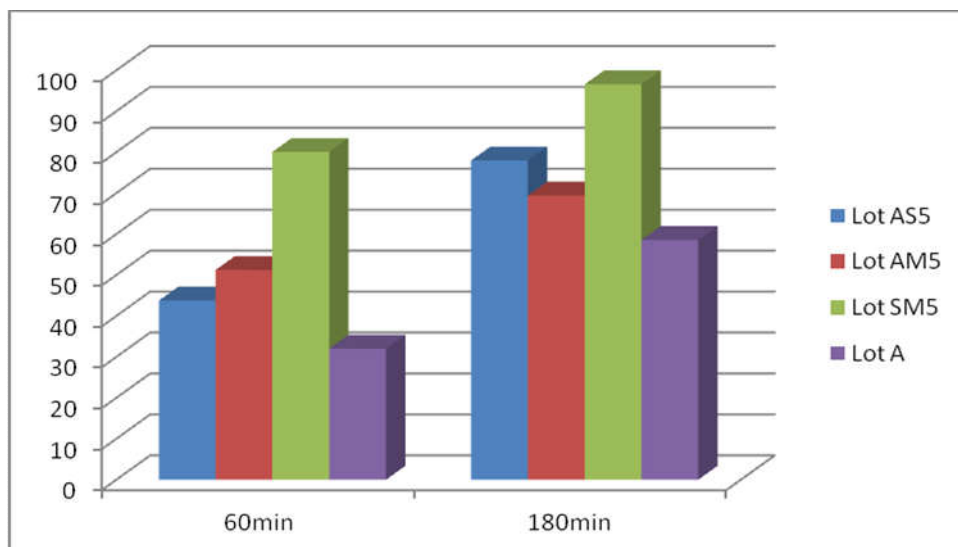
**Figure13** : présentation graphique du % INH en fonction du temps, dose de 300mg/kg.

Le graphe ci-dessus montre la variation du pourcentage d'inhibition des différents lots.

En résulte que après 60min, puis 180min d'injection du formole pour créer l'inflammation, l'effet de l'Aspirine est plus important que l'effet des solutions d'alcaloïdes. Mais moins important que l'effet des saponines.

- **Les solutions préparées à partir des saponines du *Marrubium Vulgare* est plus efficace à la dose de 300mg/kg, que l'Aspirine.**

c. Effet des solutions à une dose de 500mg/Kg par rapport à l'Aspirine :



**Figure14** : présentation graphique du  $\%_{0}$  INH en fonction du temps, dose de 500mg/kg.

- **Cette fois ci à une dose de 500mg/kg, l'effet des solution des saponines et aussi des alcaloïdes est plus important que l'Aspirine.**

## Conclusion générale

*Marrubium Vulgare* est une plante médicinale très utilisée dans le domaine pharmaceutique, cela nous permet d'être intéressés de faire ces études.

Les analyses chimiques montrent que cette plante présente des activités différentes, mais on insiste sur l'activité anti-inflammatoire.

Cette activité est due par la présence d'un des deux substances chimiques : saponine et alcaloïde.

Une extraction des deux composants par les différentes méthodes : macération, soxhlet, et reflux à partir du *Marrubium Vulgare*, permet d'avoir un extrait plus ou moins pur des saponines et des alcaloïdes.

Par évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits des alcaloïdes et des saponines.

Nous constatons que les deux composés exercent une activité importante dans l'élimination de l'inflammation. Surtout les extraits des saponines qui présentent des valeurs d'inhibition optimales par rapport à celles des alcaloïdes.

Les saponines sont des agents anti-inflammatoires naturels des fois plus efficace que les produits fabriqués.



## Références

- [1] : **Benhammou nabila. (2011)** : Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'ouest et le sud ouest Algérien. These de doctorat en biologie de l'université d'Abou Bakr Belkaid de Telemcen.p174
- [2] : **wichtl M., Anton R.** plantes thérapeutiques – tradition, pratique officinale, science et thérapeutiques, 2<sup>ème</sup> édition, Ed.Tec /Doc,2003
- [3] : **N. Ghedadba, H. Bousselfela, L. Hambaba,S. Benbia, Y. Mouloud.** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et de des sommités fleuries de *Marrubium Vulgare L.* , Pharmacognosie. 12, 15-24, 2014.
- [4] : **Débeugine G. larous des plantes** qui guérissent, Ed. Larousse, 1974
- [5] : **Paris R.R., Moysse H. Collection de précis de pharmacie sous la direction de M.-M.Janot** : Matière médicale, 2<sup>ème</sup> édition tomes 1, 2 et 3, Ed. Masson, 1976(et 1667, 1971)
- [6] : **Schneider A., Charrette U. Plantes sauvages médicinales** :  
Les reconnaître, les cueillir, les utiliser, les Editions de l'Homme, novembre1999
- [7] : **Champy P., professeur de Pharmacognosie à la faculté de pharmacie de Paris-Sud 11.**  
Phytothérapie, cours de 5<sup>ème</sup> année de Doctorat de Pharmacie,2007
- [8] : [http:// WWW.after –plustie.com /fr/abc-sante/M/697-marrube-blanc](http://WWW.after-plustie.com/fr/abc-sante/M/697-marrube-blanc)
- [9] : **Kouach A.(2011).Ammonium quarternaire du platformat** :  
Synthèse et application à l'inhibition de la carrossion acide d'acier. Université de Blida. Page99.
- [10] : **Mr Hyerisam,(2013)** : livre, médecine et santé : propriétés du marrube blanc :*Marrubium Vulgare L.*
- [11] : **Guignard et al., 1995, Harbone, 1998 et Bruneton, 1999**
- [12] : **Guignard J.L.,(2000)** : Botanique systématique moléculaire.Ed :Masson.Paris.290p
- [13] : **Bruneton, J.(1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> Ed : Tec &Doc Lavoisier. Paris. 1120p
- [14] : **Fellah O., Hameurlaine S., Bourenane N., Gherraf N., Zellagui A., Abibi A., et al. (2018)** : Climatic factors as quality determinant of essential oils and phenolics in *Romarinus officinalis L.*

Collected from three geographic areas in Algeria. *Biodiversity Journal*, 9(3) :187-194

**[15] : Abdeali F.(2007) :** Synthèses et caractérisations de nouvelles molécules contenant du soufre et de

L'azote, études de leur effet inhibiteur sur la corrosion des métaux de transition application à la

Protection du cuivre en milieux acides. Thèse doctorat. page 19

**[16] :L'équipe des enseignants du DUMENAT phytothérapie. (2011) :** Secrets et vertus des plantes

médicinales, Paris : Mr Michel, p300

**[17] : Nathalie, (2012) :** les compléments alimentaires (les plantes, vitamines et minéraux)

**[18] : S. Khoudali, D. Benmessaoud left, A. Essaqui, M. Zertoubi, M. Azzi, Mg. Bnaissa.(2014) :**

Etude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanoïque des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis L.*) du Maroc

**[19] : Ait youssef, M.(2006) .** Plantes médicinales de Kabylie. Préface du docteur J.-P. Brette.

**Bellakhdar J., (1997).** Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires La pharmacopée marocaine Traditionnelle. IBS Press. pp . 340-341

**[20] : Bremness, Lesley.,(2005).** The Complete Book of Herbs : A Practical Guide to Growing & Using Herbs,

Montréal, Reader's Digest, 272 p.

**[21] : A. Boukir,2020, Phytochemical screening, total phenolic and flavonoid methanolic extract of**

**pomegranate bark (Punica granatum L) :** Evaluation of the inhibitory effect in acidic medium 1 M HCl

**[22] : S Ait Lahcen ;** Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan

*Cistus Creticus* leaves ;2020

**[23] :** Guy Beddos Kougan Nkwokap, these, isolement et caractérisation des saponines de trois plantes de la famille des Araliaceae et Dracaenaceae et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales, 2010.

