

Type of the Paper (Article)

Évaluation de l'activité hémostatique *in vitro* de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L.

Nabil GHEDADBA^{1,*}, Leila HAMBABA¹, M. C. ABERKANE²,
S. M. Oueld-Mokhtar³, Nassima FERCHA¹, Houas BOUSSELSA¹

¹Laboratoire de chimie des matériaux et des vivants: Activité et Réactivité. Département des sciences de la nature et de la vie, Faculté des Sciences, Université El-Hadj-Lakhdar. 05000. Batna, Algérie.

²Laboratoire de Phytochimie, Faculté des Sciences, Département des Sciences de la matière, Université El-Hadj-Lakhdar, Batna. Algérie.

³Unité de Biodiversité et Valorisation des Ressources Végétales (BVRV) – Faculté des Sciences et Techniques (FST)- Université des Sciences, de Technologie et de Médecine (USTM) Nouakchott, Mauritanie.

* E-mail: viamessi@gmail.com

Received: 11-05-2014 /Accepted: 05-08-2014

Résumé: L'objectif de cette étude est d'évaluer *in vitro* l'activité hémostatique des métabolites secondaires des feuilles de *Marrubium vulgare*. L'analyse qualitative de l'extrait aqueux (EAQ) par la chromatographie sur couche mince a révélé la présence de la quercétine, la rutine et le kaempférol. La quantification des phénols totaux par la méthode de Folin Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode AlCl₃ a donné des valeurs élevées avec l'EAQ : 175 ± 0,80 mg EAG/100g de MS, 23,86 ± 0,36 mg EQ/100g de MS. De plus, le dosage des tanins condensés par la méthode de la vanilline a montré que l'EAQ contient la valeur la plus élevée : 16,55 ± 0,03 mg E-Catéchine/100g de MS. L'évaluation de l'activité hémostatique par la méthode de recalcification du plasma décalcifié nous a permis de découvrir l'effet anticoagulant de l'EAQ lyophilisé des feuilles de *M. vulgare*. Une corrélation linéaire positive entre les deux paramètres étudiés (la teneur en tanins condensés et l'activité hémostatique (r = 0,96)) ont permis de mettre en évidence un rôle probable de ces composés qui sont des vaso-constricteurs puissants dans l'activité hémostatique.

Mots clés : *Marrubium vulgare* L.; extrait aqueux; dosage des composés phénoliques; activité hémostatique; tanins condensés.

I. Introduction

L'analyse de coagulation sanguine pour empêcher l'hémorragie ou éviter le souffrant de thrombose nous a motivé de rechercher de molécules bioactives naturelles capables de coaguler le sang en testant l'activité hémostatique. *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae), riche essentiellement en composés phénoliques, est employée couramment dans la médecine traditionnelle pour guérir certaines maladies [1, 2, 3].

Marrubium vulgare possède des effets hypoglycémiant et hypolipidémiant [2, 4, 5]. Arellano *et al.* [4], ont démontré que cette plante diminue la glycémie (effet hypoglycémiant) et les taux de lipides sériques (effet hypolipidémiant) chez les patients diabétiques de type 2 (syndrome polyuro-polydipsie). Une étude plus récente établie par Elberry *et al.* [2], a montré que l'administration de l'extrait méthanolique du marrube (500 mg/Kg par jour) chez les rats diabétiques induits par la streptozotocine a eu comme effet une réduction considérable du glucose en entraînant la stimulation du pancréas [2], vasorelaxant et antihypertensif par effet antagoniste calcique, provoque une

relaxation artérielle identique à celle de l'amlodipine et supérieure à celle de l'adrénaline (marrubénol), entraîne une correction du dysfonctionnement endothélial dû à l'hypertension [6], anticholinestérase contre l'acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase sous l'action de l'eugénol [7].

M. vulgare possède aussi un effet antioxydant [8], en effet la richesse de cette plante par des phénylpropanoïdes glycosides a pu expliquer son activité antioxydante, en empêchant l'oxydation de LDL et augmentant le transport renversé de cholestérol et peuvent empêcher ainsi le développement des maladies cardiovasculaires. Ces propriétés antioxydantes augmentent le potentiel anti-athérogénique de HDL en favorisant le flux de cholestérol dans les macrophages humains THP1 [1], antimicrobien selon les travaux de Castillo-Juárez *et al.* [9], l'extrait méthanolique de la plante *M. vulgare* à une concentration de 31.2 µg/ml possède une activité anti-*Helicobacter pylori* ATCC 43504 significative. Cela est dû au flavonoïde (la quercétine) qui a un effet inhibiteur sur l'uréase de la bactérie [10]. Une autre étude réalisée par Molina-Salinas *et al.* [11] a révélé que l'extrait méthanolique, aqueux, l'extrait de l'acétone et de l'hexane de la plante ont eu l'effet inhibiteur efficace contre *Mycobacterium tuberculosis* (agent causatif de la tuberculose) à une concentration supérieur à 200 µg/ml [11], antispasmodique, anti-inflammatoire par inhibition de la cyclooxygénase Cox2, analgésique [12,13]. Ce potentiel d'activités biologiques est dû à la richesse de *M. vulgare* en principes actifs: les diterpènes comme la marrubiine et le marrubénol [14], les flavonoïdes comme ladanéine, l'apigénol, le quercétol [15], les huiles essentielles comme l'eugénol, β-caryophyllène [16], les acides phénoliques comme l'acide gallique [16] et les tanins [17]. Récemment, Ohtera *et al.* [18] ont pu identifier un nouveau composé à partir de l'extrait méthanolique de *M. vulgare* c'est l'acide 6-octadécynoïque. L'objectif global de cette étude est de déterminer la teneur des extraits de *M. vulgare* en métabolites secondaires particulièrement en tanins condensés et d'évaluer *in vitro* l'activité hémostatique des extraits des feuilles de cette plante par la méthode de recalcification du plasma décalcifié.

II. Matériels et Méthodes

II. 1. Matériel végétal

L'espèce sélectionnée a été collectée dans leur habitat naturel. Le *Marrubium vulgare* récolté dans la région de Touffana à 52 Km de la ville de Batna (Nord-est de l'Algérie) entre le mois d'Avril et Mai 2012. Après la récolte, le matériel végétal est séché à l'ombre (à température ambiante) dans un endroit sec et aéré, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, en minimisant les divers mécanismes de fermentation et de dégradation inhérents au caractère organique de cette matière première. Ensuite, le matériel végétal est séché dans une étuve à 30°C pour éliminer l'humidité totale, puis finement broyé au laboratoire de Zootechnie (Institut des Sciences Vétérinaires et Sciences Agronomiques

II. 2. Préparation des extraits des feuilles de *Marrubium vulgare*

Selon le protocole de Diallo *et al.* [14], les différents types d'extraits ont été préparés à partir des feuilles pulvérisées (100g) en utilisant 1L des solvants à polarité croissante (éther de pétrole, dichlorométhane, butanol, méthanol). A la fin de l'extraction, les quatre extraits organiques ont été concentrés sous vide au Rotavapor (HEIDOLPH ROTAVAPOR) aux températures 35 C°, 40 C° et 50 C° respectivement. Après concentration, ces extraits ont été séchés à l'air libre. Pour l'extrait aqueux, une macération aqueuse de 100 g de la poudre à raison de 1 L d'eau distillée a également été effectuée. L'extrait aqueux obtenu est ensuite centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 minutes pour se débarrasser des débris de plante. La phase aqueuse du macérat a été ensuite filtrée sur un papier filtre. Le filtrat obtenu est ensuite mis dans des tubes, congelé à -20°C puis lyophilisé. La congélation de l'extrait lyophilisé à -20°C est une condition nécessaire afin de garder intacte les molécules extraites de la partie aérienne de *M. vulgare*.

II. 3. Criblage phytochimique

II. 3. 1. Caractérisation des Flavonoïdes (*Test de Shibata ou Shinoda test*)

La présence des flavonoïdes dans les différents extraits a été mise en évidence par la réaction à la cyanidine. Une quantité de 0,5 g de chaque extrait a été dissous dans 1,5 ml du méthanol (50%) et chauffé sur le bain d'eau bouillante. Cinq ml d'HCl et quelques fragments de magnésium ont été ajoutés. Après dégagement d'hydrogène par réduction des flavonoïdes aglycones en anthocyanes, nous obtiendrons une coloration rouge [15].

II. 3. 2. Caractérisation des Tanins (*Test au FeCl₃*)

Une quantité de 15 ml du réactif de Stiasny a été ajoutée à 5 ml de chaque extrait. Le mélange a été maintenu au bain-marie à 80°C pendant 30 min. L'observation d'un précipité en gros flocons caractérise la présence des tanins catéchiques. Pour les tanins galliques, nous avons filtrés la solution précédente. Le filtrat est recueilli et saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl₃ provoque l'apparition d'une coloration bleu-noir intense, signe de la présence de tanins galliques [16].

II. 4. Caractérisation des extraits aqueux par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les cinq extraits ont été analysés en utilisant la chromatographie sur couche mince en tant qu'empreinte digitale. Des plaques en aluminium (silica-gel, de marque Merck, 60 GF₂₅₄, de taille 20 x 20 cm ont été utilisées en employant un éluant: chloroforme/méthanol /eau (65:35:5; v/v/v) en tant que système de solvants pour les extraits polaires, tandis que pour les extraits apolaires en utilisant: l'éther de pétrole/acétate éthylique (80:20; v/v) [14].

Sept témoins ont été employés: la quercétine, la rutine, le kaempférol, l'acide gallique, l'acide caféique, acide *trans*-Cinnamique, acide 4-hydroxybenzoïque (Sigma Aldrich). La chromatographie sur couche mince a été observée sous la lampe UV à 254-366 nm et par la pulvérisation du réactif: la vanilline sulfurique. La détection des composés ayant un balayage d'activité de DPPH est effectuée par pulvérisation d'une solution méthanolique de DPPH (à 2 mg/ml). Les taches jaunes indiquent la présence des composés actifs. Les rapports frontaux (R_f) des taches résultantes de la séparation ont été calculés et comparés à ceux des témoins [14].

II. 5. Dosage des polyphénols totaux

200 µl de chaque extrait ont été mélangés à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dix fois et à 2 ml de H₂O, et incubés à la température ambiante pendant 4 minutes. Après addition de 0,8 ml de bicarbonate de sodium de 7,5 % au mélange, les polyphénols totaux étaient déterminés après 2 heures d'incubation à la température ambiante. L'absorbance de la couleur bleue a été mesurée au $\lambda_{\max} = 765$ nm avec un spectrophotomètre de Shimadzu UV-VIS. La quantification a été faite en utilisant une courbe standard de l'acide gallique. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique (EAG) par 100g de la matière sèche [19].

II. 6. Dosage des flavonoïdes totaux

Une quantité de 1 ml de chaque échantillon et de standard (préparée dans le méthanol) a été ajoutée à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2 % dissous au méthanol). Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée par rapport au blanc préparé de réactif au $\lambda_{\max} = 430$ nm. Les concentrations des flavonoïdes ont été déduites à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (0-35 µg/ml). Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de quercétine par 100g de la matière séchée: mg EQ/100g de la matière sèche [20].

II. 7. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode de la vanilline décrite par Julkumen-Titto [21]. En effet, la vanilline réagit avec les flavan 3-ols libres et les unités terminales des proanthocyanidines donnant une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle aux taux de flavanols présents dans le milieu et qui présente un maximum d'absorption à 500 nm de longueur d'onde.

Des aliquotes de 0,1 à 1 ml de la solution mère (0,5 mg/ml) de catéchine et des extraits ont été introduits dans une série de tubes à essai, le volume finale dans chaque tube a été complété à 1ml par addition de méthanol absolu. 1,5 ml de la vanilline à 4% solubilisé dans le méthanol et 750 µl de l'HCl (12M) à 37% ont été ajoutés et à une minute d'intervalle à chaque tube de la série et mis par la suite au bain marie réglé à 30°C pendant 20 minutes. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de catéchine (mg EC) par 100g de la matière sèche.

II. 8. Test de l'activité hémostatique

Ce test a été effectué *in vitro* sur le plasma sanguin provenant d'une personne saine adulte mâle (25 ans) avec l'extrait aqueux de la partie aérienne du *Marrubium vulgare*. Le principe de ce test consiste à mesurer le temps de coagulation d'un plasma décalcifié après recalcification [22]. Pour cela, Le sang est recueilli sur citrate de sodium chez des sujets sains. Le plasma est obtenu à partir du sang centrifugé à 3600 tours par minute, pendant 10 minutes.

Ensuite, À l'aide d'une micropipette des volumes de 10 µl à 500 µl, nous avons reparti à raison de 10µl, 50 µl, 100 µl, et 200 µl d'extrait aqueux (100 mg/1ml) dans des tubes à essai pour chaque volume. Un autre tube à essai vide a servi de témoin n'a reçu aucune dose de l'extrait. Les tubes sont maintenus au bain marie à 37° C. Nous ajoutons dans chaque tube 200 µl de plasma et 200 µl de chlorure de calcium (CaCl₂) à 0,025M.

Le chronomètre a été déclenché dès la pénétration du plasma dans le tube. Les observations ont commencés dès toutes les 30 secondes au début, puis fréquemment par la suite, jusqu'à ce que l'on observe la prise en masse du caillot, en notant le temps de coagulation pour les 2 tubes de chaque dose. L'évaluation de la coagulation a été faite en penchant le tube sous un angle de 45° afin de constater la présence ou non d'un coagula. Le test est positif si le temps de coagulation d'un sang contenant un extrait est inférieur à celui du sang témoin.

II. 9. Analyse statistique

Toutes les mesures expérimentales ont été effectuées en triple et sont exprimées en tant que moyenne d'écart type ± de trois analyses (moyen (SE) ± d'écart type). L'analyse statistique a été exécutée en utilisant l'analyse de la variance à sens unique (ANOVA). Si la *P*-valeur globale s'avérait statistiquement significative (*P* < 0,05). Toute l'analyse statistique et l'importance de la corrélation entre les variables ont été exécutées en utilisant le logiciel (Graph Pad Prism V 5.00).

III. Résultats et Discussion

III. 1. Rendement des extraits de *Marrubium vulgare*

Chaque extrait a été caractérisé par son rendement, son aspect et sa couleur par rapport à la poudre sèche. Ces éléments sont présentés dans la Figure 1.

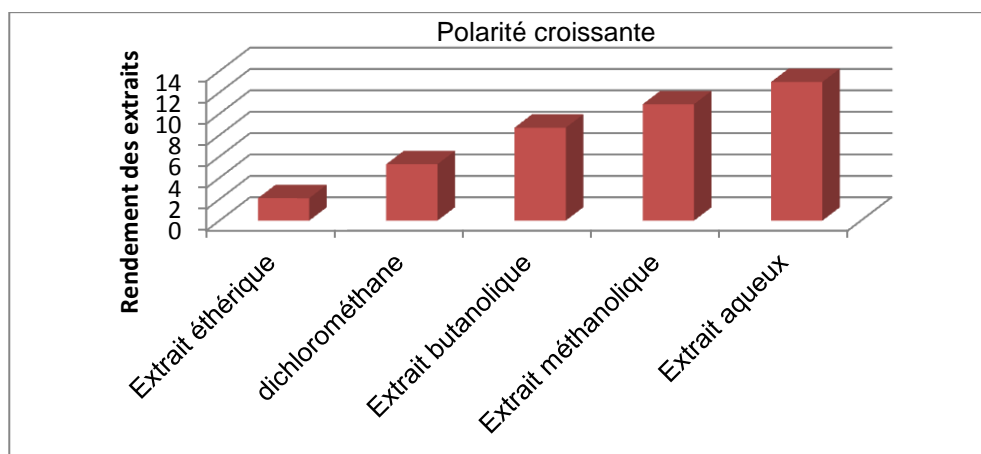


Figure 1. Rendement des extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* en fonction des solvants de polarité croissante.

Les résultats présentés dans la figure 1 montrent que l'extrait aqueux (EAQ) lyophilisé donne la valeur la plus élevée (12,98 %), suivi par l'extrait méthanolique (EMeOH) qui a donné un rendement de (10,9 %). Cependant, l'extraction à l'éther de pétrole, qui a pour but de délipider la matière végétale, a conduit à un rendement faible de 2,1 %. Nous pouvons dire que les solvants polaires donnent des rendements meilleurs que les solvants apolaires, étant donné que les solvants polaires ont la capacité de diffuser à l'intérieur de la poudre végétale, d'atteindre la matrice végétale et de récupérer par conséquent le plus possible des métabolites. Tandis que les solvants apolaires, non miscibles avec l'eau, n'ont pas la capacité d'extraire le maximum des molécules bioactives à cause de la présence de l'eau contenue dans le tissu végétal.

Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs, plus récemment Stanković [23] a préparé cinq extraits, un à l'acétone, un à l'acétate d'éthyle, un à l'éther de pétrole et deux extraits polaires (aqueux et méthanolique) à partir de la plante *Marrubium peregrinum* et a montré que l'extraction méthanolique permettait d'atteindre un rendement de 1.98 ± 0.082 g, alors que l'extraction à l'éther de pétrole conduisait à un rendement limité de 0.15 ± 0.014 g. Il s'ensuit, que le rendement d'extraction et la composition des extraits varient selon la nature du solvant, la période, le lieu de la récolte et la durée de séchage. La méthode d'extraction peut influencer elle-même sur le rendement d'extraction, Erdogan-Orhan et al. [7] ont réalisé une extraction par lixiviation à chaud (percolation type soxhlet 8 à 12h) de *M. vulgare* en utilisant l'acétone comme solvant. Ces auteurs ont obtenu un rendement de 6,6 % (P/P), valeur sensiblement supérieure à celle que nous avons obtenue dans cette étude en utilisant le dichlorométhane (5,28 %) (P/P). Cela peut être expliqué probablement par l'effet que l'efficacité de l'extraction au soxhlet est liée au solvant qui se condense et qui vient au contact du végétal est toujours pur, permettant de meilleurs coefficients de partage, alors que dans le cas de la macération, le solvant utilisé pour l'extraction de la matière végétale peut arriver à un certain degré de saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraction au cours du procédé.

III. 2. Chromatographie sur couche mince (CCM):

Le suivi des extraits par chromatographie sur couche mince en utilisant le réactif de Godin a montré plusieurs taches dans chaque extrait. Après comparaison avec les standards disponibles, les taches ont été éluées dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:35:5). Nous avons révélés la probabilité de présence de l'acide gallique ($R_f = 0,82$) qui a été identifié dans nos précédents travaux [8], de la quercétine ($R_f = 0,66$), de la rutine ($R_f = 0,51$), de kaempférol 3-O-glucoside ($R_f = 0,62$) dans l'EMeOH. Ces flavonoïdes ont été mis en évidence et purifiés à partir de différents végétaux. Par exemple, Rigano *et al* [24] ont identifié et purifié 11 flavonoïdes à partir de l'extrait méthanolique de la plante *Marrubium globosum* dont le kaempférol-3-O-glucoside et la quercétine. De plus, deux nouveaux métabolites ont été révélés pour la première fois : l'acide *trans*-Cinnamique : $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$ ($R_f = 0,59$) et l'acide 4-hydroxybenzoïque : $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ ($R_f = 0,54$). Les taches des chromatogrammes des extraits d'éther de pétrole ($R_f = 0,18; 0,34; 0,47; 0,71$), dichlorométhane ($R_f = 0,25; 0,47; 0,72; 0,69$) se colorent en violet après révélation au réactif de Godin. Ces taches indiquent la présence, probablement des stéroïls et des triterpènes.

Après révélation à l'aide d'une solution méthanolique de DPPH à 2 mg/ml (mise en évidence de l'activité antiradicalaire), les extraits dichlorométhanique, butanolique, méthanolique et aqueux ont donné des taches jaunes, ce qui indique que les composés antioxydants inclus par chaque extrait ont la capacité de réduire le radical de DPPH.

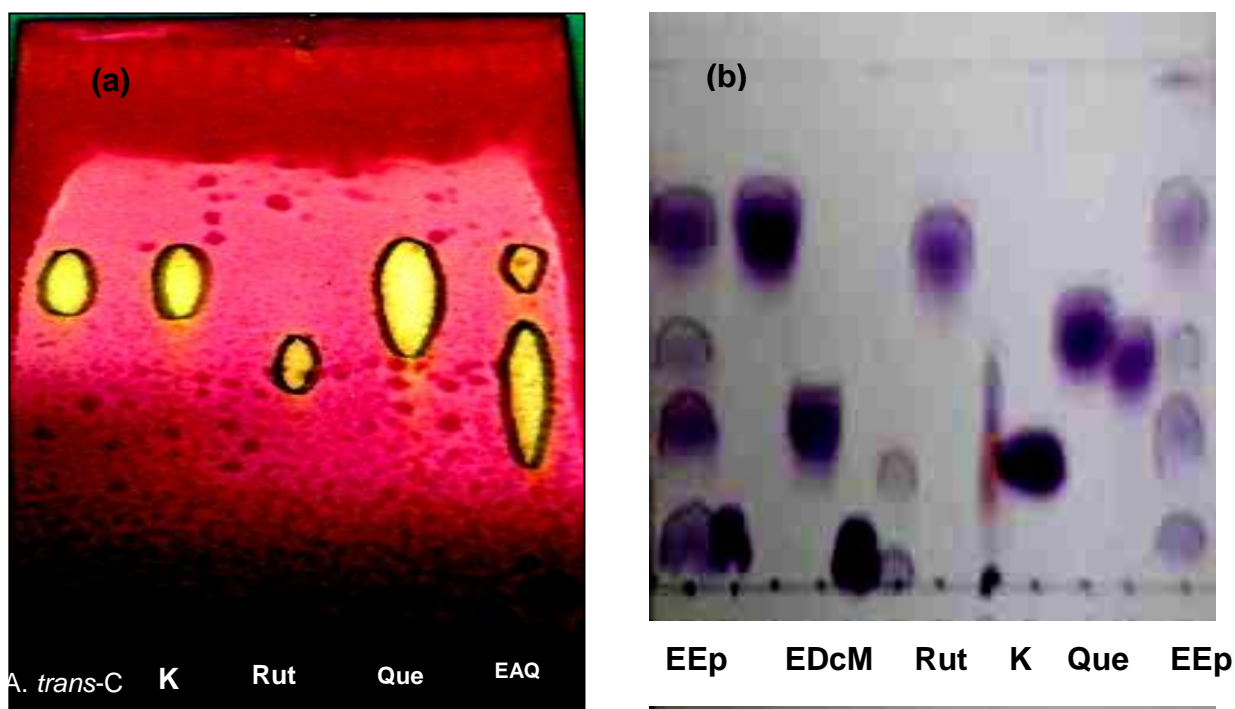


Figure 2. Chrommatogrammes des extraits de *M. vulgare*: (a) Activité antiradicalaire de l'EAQ de *M. vulgare* (révélation par une solution méthanolique de DPPH). (b) Mise en évidence des stérols et triterpènes dans l'EDcM et l'EEp de *Marrubium vulgare*.

III. 3. Dosage des Polyphénols et des Flavonoïdes :

Le contenu phénolique dans les extraits examinés de *M. vulgare* utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est exprimé en termes d'équivalents d'acide gallique (courbe d'étalonnage : $y = 0,008x + 0,070$; $R^2 = 0,992$). Les résultats obtenus, exprimés en mg EAG/100g de la matière sèche (Figure 3), varient entre $25 \pm 0,2$ et $195 \pm 0,36$ mg EAG/100g de MS. La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait méthanolique et aqueux. La teneur élevée en polyphénols dans l'extrait méthanolique est liée à la solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires.

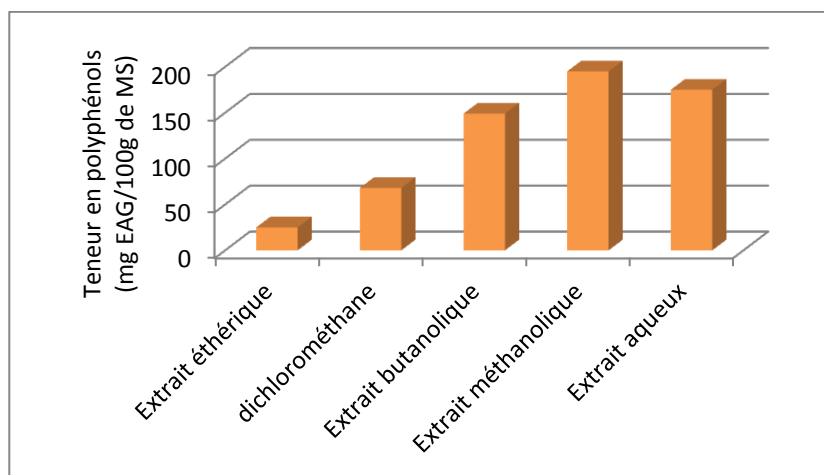


Figure 3. Teneur des polyphénols totaux dans les extraits de *M. vulgare*.

Les concentrations des flavonoïdes dans les différents extraits du *Marrubium vulgare*, représentée par la Figure 4, a été déterminée en utilisant la méthode spectrophotométrique avec du chlorure d'aluminium. Cette concentration est exprimée en mg équivalent de quercétine EQ/100g de la matière sèche. La courbe d'étalonnage : $y = 0,032x - 0,002$; $R^2 = 0,994$. Les résultats obtenus montrent que les concentrations des flavonoïdes dans les extraits de *M. vulgare* varient entre 3,15 et 33,10 mg EQ/100g de MS. La concentration des flavonoïdes dans l'extrait de méthanol était $33,10 \pm 0,60$ mg EQ/100g de MS, suivie par l'extrait aqueux lyophilisé ($23,86 \pm 0,36$) et butanolique ($20,90 \pm 0,78$). La plus faible concentration de flavonoïde a été mesurée dans l'EEp ($3,15 \pm 0,17$ mg EQ/100g de MS). La concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits [8, 25].

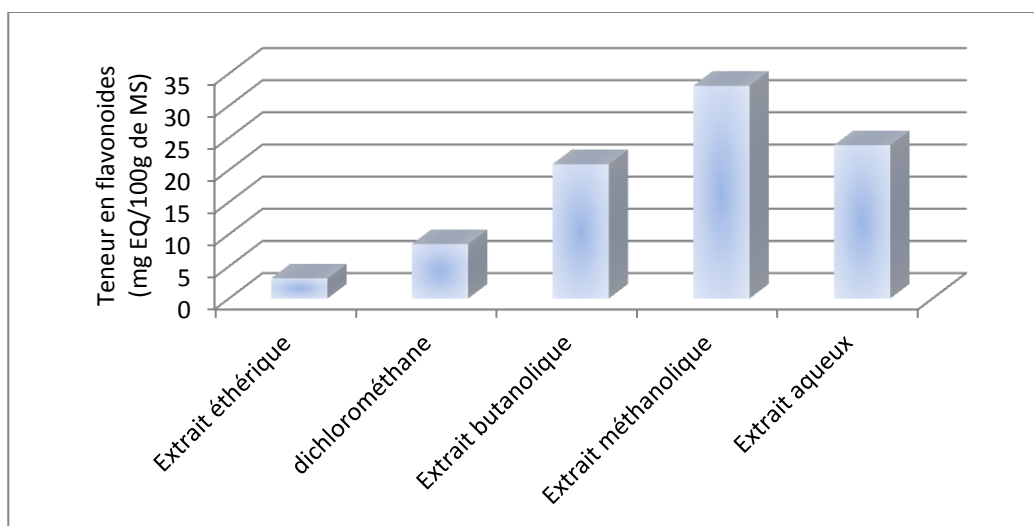


Figure 4. Teneur en flavonoïdes dans les extraits de *M. vulgare*.

La teneur des molécules bioactives varient selon certains paramètres pendant la croissance de la plante telles que: la salinité, sécheresse et exposition solaire qui agissent sur la biosynthèse des métabolites secondaires. [26]. Selon Wojdylo *et al.* [27], la teneur en composés phénoliques variées également en fonction de la méthode d'extraction. En outre, Wojdylo *et al.* [27] ont testé six espèces de *Labiatae*, ils ont constaté que les teneurs phénoliques totales de ces six espèces ont diminuées dans l'ordre suivant : baume > sauge > marrube > romarin > thymus > origan. La teneur en composés phénoliques peut correspondre en premier lieu aux flavonoïdes, car selon certains auteurs, le Marrube contient des taux significatifs en flavones et en flavonols [28]. La teneur en composés phénoliques des extraits organiques et aqueux peut correspondre secondairement aux tanins sous forme condensée, aux acides phénoliques. Ainsi, Wojdylo *et al.* [27] ont indiqué la présence de l'acide caféique, l'acide *p*-comarique et l'acide férulique. Il faut tenir compte que le contenu en composés phénoliques totaux peut correspondre à un moindre degré aux stérols présumés être dans le Marrube [29, 30]. Selon Boizot et Charpentier [31]; Gomez-Caravaca *et al.* [32], les résultats de dosage des composés phénoliques totaux ne peuvent pas indiquer exactement les teneurs des extraits en ces composés, parce que malgré la sensibilité de la méthode de Folin Ciocalteu, ce réactif peut réagir encore avec les acides aminés aromatiques des protéines (surtout avec le tryptophane), les glucides réducteurs comme le glucose et le fructose et la vitamine C (problèmes d'interférences).

La teneur en flavonoïde varie en fonction de solvant utilisé, c'est pourquoi, Bruneton [33]; Stanković [23] ont signalé que les hétérosides de flavonoïdes sont solubles dans les solvants polaires comme les mélanges méthanol-eau parfois et l'Acétonitrile-eau, alors que pour les génines (partie aglycone des flavonoïdes) sont solubles dans les solvants apolaires. Dans ce dosage, il est apparaît que la plupart des flavonoïdes de *M. vulgare* sont des flavonoïdes glycosylés car ont le pouvoir d'être mieux solubilisé dans les solvants polaires que les solvants apolaires.

III. 4. Dosage des tanins condensés

Les concentrations des tannins condensés sont reportées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Contenu total de tanins condensés dans les extraits de feuilles de *M. vulgare*.

Extrait	Tanins *
Ether de pétrole	-
Dichlorométhane	-
<i>n</i> -Butanol	0,92 ± 0,16
Méthanol	5,75 ± 0,42
Eau (extrait aqueux)	16,55 ± 0,03 **

* mg EC par 100 g de la matière sèche ;
 ** valeur hautement significative ($P \leq 0,001$).

D'après le tableau 1, l'extrait aqueux contient la teneur en tanins la plus élevée (16,55 ± 0,03 mg EC par 100g de MS). Ce résultat est en accord avec de nombreux résultats de chercheurs qui ont indiqués que l'extrait aqueux enregistre des teneurs les plus élevées en tanins condensés suivie par l'extrait éthanolique. Par contre, le méthanol extrait faiblement les tanins quel que soit la méthode d'extraction. Cependant, à haute température, l'eau et l'acétone extraient aussi des substances indésirables comme les protéines, les lipides et les colorants non phénoliques qui causent des interférences lors de dosage des tanins. Nous pouvons alors conclure que l'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires. Or, les teneurs en tanins condensés peuvent être variables aussi en raison de plusieurs facteurs tels que : la sensibilité des tanins à des plusieurs voies de dégradation (l'oxydation, la lumière...), le stade de maturité des fruits, les conditions culturales, climatiques, pédologiques ou le stress de prédation [34].

III. 5. Activité hémostatique

Le choix d'étudier l'activité hémostatique sur l'extrait aqueux de la plante *Marrubium vulgare* est motivé en raison de son utilisation déclarée en médecine traditionnelle par macération ou décoction dans l'eau.

Tableau 2. Temps de recalcification du plasma en tube de l'extrait aqueux des feuilles sèches de *Marrubium vulgare*.

Volume de l'extrait (en µl)	Temps de coagulation (en second)	
	Plasma avec l'extrait	Témoin
20µl	1.33 (93s)	
50µl	1.22 (82s)	1.51 (111s)
100µl	1.19 (79s)	
200µl	1.16 (76s)	

Aux doses de 20 µl, 50,100 et 200 µl successivement de l'extrait lyophilisé des feuilles sèches de *Marrubium vulgare* confère une diminution du temps de recalcification de plasma *in vitro* en tube. C'est une diminution dose dépendante de cet extrait, donc notre extrait accélère la coagulation du plasma. Ce résultat est une indication intéressante en faveur d'une activité hémostatique et astringente de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare*. Il est important de souligner ici que cette activité astringente favorise la vasoconstriction, ce qui est un paramètre important dans l'hémostase. Cette vasoconstriction est due à la présence de tanins dans cette plante. Ces résultats sont

semblables à ceux trouvés par Aouissa [35]. Ce dernier a constaté que la propriété astringente est liée à la teneur des tanins dans les feuilles de *Mangifera indica*. Ce résultat a été confirmé par Dandjesso *et al.* [36] en étudiant les extraits des feuilles de quatre plantes médicinales couramment vendus par les herboristes dans le sud du Bénin pour le traitement des saignements, il s'agit des plantes suivantes : *Annona senegalensis*, *Newbouldia laevis*, *Cassythia filiformis* et *Cissampelos mucronata*.

En effet, les tanins ont un effet hémostatique et vasoconstricteur sur les petits vaisseaux, ainsi que leur utilisation contre les varices et les hémorroïdes [33]. Selon Bruneton [33], les tanins utilisés par voie orale, sont vasoprotectrice; ils limitent la perte des liquides et favorisent la régénération des tissus en cas de blessure ou de brûlure superficielle.

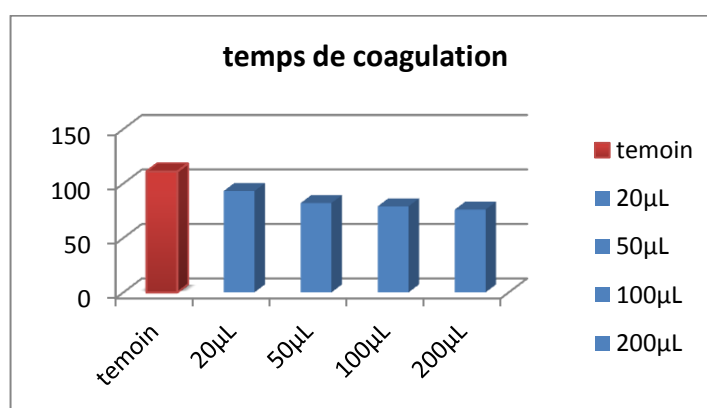


Figure 5. La diminution du temps de recalcification avec la croissance de dose de l'extrait aqueux des feuilles sèches de *Marrubium vulgare*.

D'après les résultats trouvés, nous pouvons dire qu'il existe une corrélation linéaire positive entre les deux paramètres étudiés : la teneur en tanins condensés et l'activité hémostatique ($r = 0,96$).

IV. Conclusion

Les résultats obtenus dans ce travail confirment l'importance et l'effet thérapeutique de l'espèce *M. vulgare*. Cette plante est considérée une source naturelle de composés anticoagulants d'importance élevée. L'analyse qualitative par la CCM a montré la présence de l'acide gallique, la quercétine, la rutine, kaempférol 3-O glucoside et deux nouveaux métabolites: l'acide *trans*-Cinnamique et l'acide 4-hydroxybenzoïque. La concentration la plus élevée des composés phénoliques a été obtenue en utilisant des solvants de polarité croissante. L'extrait méthanolique a donné la plus grande valeur en composés phénoliques et en flavonoïdes. Tandis que, l'extrait aqueux lyophilisé a donné la valeur la plus élevée en tannins condensés. Le contenu élevé des composés phénoliques et la corrélation linéaire significative entre les valeurs de la concentration des composés phénoliques et l'activité hémostatique a indiqué que ces composés contribuent à l'activité anticoagulante. Cela peut être dû aux groupements hydroxyles phénoliques des tanins comme le catéchine capables de réagir avec de fortes liaisons hydrogène avec les atomes de la protéine de liaison peptidique en inhibant la thrombine par exemple, une enzyme protéolytique qui transforme le fibrinogène une molécule soluble en une molécule insoluble, la fibrine. Des études plus approfondies *in vivo* sur l'activité antidiabétique, anti-inflammatoire, anti-apoptotique et antiproliférative seraient nécessaires dans les années à venir pour mieux comprendre le mécanisme d'action des molécules bioactives de cette plante, leur dose thérapeutique ainsi que leur site d'action au niveau de la cellule.

V. Références bibliographiques

- [1] Berrougui, H., Maxim, I., Cherki, M., Khalil, A., *Marrubium vulgare* extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP macrophage, *Life Sciences*, 80(2006) 105–112.
- [2] Elberry, A. A., Harraz, F. M., Ghareib, S. A., *et al.*, Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in Streptozotocin-induced diabetic rats, *Int. J. Diabetes Mellit*, 11(2011) 1877-1888.
- [3] Pukalskas, A., Venskutonis, P. R., Salido, S., *et al.*, Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania, *Food Chem*, 130(2012) 695–701.
- [4] Arellano, A. H., Santamaría, L. A., Hernández, B. G., Torres, N. P., *et* Tortoriello, J., Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics, *Phytomedicine*, 11(2004) 561–566.
- [5] Boudjelal, A., Henchiri, C., Siracusa, L., Sari, M., Ruberto, G., Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion, *Fitoterapia*, 83 (2012) 286-292.
- [6] El-Bardai, S., Lyoussi, B., Wibo, M., Morel, N., Comparative study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat, *Clin Experiment Hypertension*, 26(2004) 465-474.
- [7] Erdogan-Orhan, E., Belhattab, R., Senol, F. S., Gülpinar, A. R., Hosbas, S., *et* Kartal, M., Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare subsp. glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species, *Industrial Crops and Products*, 32(2010) 566-571.
- [8] Ghedadba, N., Bousselesla, H., Hambaba, L., Benbia S., Mouloud, Y., Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L, *Phytothérapie*, 12(2014) 15-24.
- [9] Castillo-Juárez, I., Gonzalez, V., Jaime Aguilera, H., Martineza, G., Linares, E., Byeb, R., *et* Romero, I., Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders, *J. Ethnopharmacol*, 122(2009) 402–405.
- [10] Cushnie, T. P. T., Lamb, A.J., Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids, *Int J Antimicrob Agents*, 38(2011) 99-107.
- [11] Molina-Salinas, G. M., Ramos-Guerra, M. C., Vargas-Villarreal, J., Mata-Cardenas, B. D., Becerril-Montes, P., *et* Saïd-Fernandez, S., Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Flourensia cernua* DC against Strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Arc. Med. Res*, 37(2006) 45-49.
- [12] Stulzer, H. K., Tagliari, M. P., Zampirolo, J. A., Cechinel-Filho, V., *et* Schlemper, V., Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*, *Journal of Ethnopharmacology*, 108:3(2006) 379-384.
- [13] Meyre-Silva, C., Yunes, R. A., Schlemper, V., Campos-Buzzi, F., *et* Cechinel-Filho, V., Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpène present in *Marrubium vulgare*, *Brazil Farmaco*, 60 :4(2005) 321–326.
- [14] Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traré, A., Coulibaly, K., Maïga, A., Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali, *C.R.Chimie.*, 7 (2004) 1073-1080.
- [15] Aliyu, A. B., Musa, A. M., Abdullahi, M. S., Ibrahim, H., *et* Oyewale, A. O., Phytochemical screening and antibacterial activities of *Vernonia ambigua*, *Vernonia blumeoides* and *Vernonia ocephala* (ASTERACEAE), *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 68(2011) 67-73.
- [16] N'GUESSAN, K., KADJA, B., ZIRIHI, G. N., TRAORÉ, D., AKÉ-ASSI, L., Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire), *Sciences & Nature*, 6(2009) 1-15.
- [17] Djahra, A. B., Bordjiba, O., Benkherara, S., Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.), *Phytothérapie*, 11 (2013) 348-352.
- [18] Ohtera, A., Miyamae, Y., Nakai, N., Kawachi, A., *et al.*, Identification of 6-octadecynoic acid from a methanol extract of *Marrubium vulgare* L. as a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440 (2013) 204-209.
- [19] Wong, S. P., Leong, L. P., William-Koh, J. H., Antioxidant activities of extracts of selected plants, *Food Chem*, 99(2006) 775–783.
- [20] Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., *et al.*, Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation, *Arznein Forsch/Drug Res*, 46(1996) 1–6.
- [21] Julkunen-Titto, R., Phenolic constituent in the leaves of northern willows : Methods for the analysis of certain phenolics, *Journal of Agriculture and Food chemistry*, 33 (1985) 213-217.

- [22] Brummel, K. E., Paradis, S. G., Butenas, S., Mann, K. G., Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation, *Blood*, 100:1(2002) 148-152.
- [23] Stanković, M. S., Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts, *Kragujevac J. Sci.*, 33(2011) 63-72.
- [24] Rigano, D., Aviello, G., Bruno, M., Formisano, C., Rosselli, S., Capasso, R., Senatore, F., Izzo, A. A., Borrelli, F., Antispasmodic effects and structure-activity relationships of labdane diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. *Libanoticum*, *J. Nat. Prod*, 72(2009) 1477–1481.
- [25] Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J. M., Stocker, P., Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants, *Food Chem Toxicol*, 48(2010) 2599–606.
- [26] Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bourouai, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., et Abdelly, C., Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *C. R. Biologies*, 331(2008) 372-379.
- [27] Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R., Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, *Food Chem*, 105(2007) 940–949.
- [28] Nawwar, M. A. M., El-Mousallamy, A. M. D., Barakat, H. H., Buddrus, J., et Linscheid, M., Flavonoids lactates from leaves of *Marrubium vulgare*, *Phytochemistry*, 28(1989) 3201–3206.
- [29] Zlatanov, M. D., et Antova, G. A., Composition of biologically active lipids of *Lamiaceae* seed oils, *Grasas y Aceites*, 55(2004) 143-147.
- [30] Dendougui, H., Seghir, S., Belloum, Z., Benayache, F., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., et Benayache, S., A New Labdane Diterpene and Other Constituents from *Marrubium deserti* Noe ex coss, *Rec. Nat. Prod*, 5 :4(2011) 300-304.
- [31] Boizot, N., et Charpentier J. P., Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier, *Le cahier des Techniques de l'Inra*, (2006) 79-82.
- [32] Gomez-Caravaca, A. M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., et Fernandez-Gutierrez, A., Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees, *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(2006) 1220-1234.
- [33] Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, (2009), 1288.
- [34] Mahmoudi, S., Khali, M., et Mahmoudi, N., Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut : *Cynara scolymus* L, *Nature & Technologie*, 9(2013) 35- 40.
- [35] Aouissa, I. W. R., Etude des activités biologiques et de la toxicité aigüe de l'extrait aqueux des feuilles de *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae), Thèse de pharmacie. Bamako: Université de Bamako, (2002) 127.
- [36] Dandjesso, C., Klotoé, J. R., Dougnon, T. V., Sègbo, L. J., Atègbo, J. M., Gbaguidi, F., Fahl, L., Fanoul, B., Lokol, F., Dramane, K., Phytochemistry and hemostatic properties of some medicinal plants sold as anti-hemorrhagic in Cotonou markets (Benin), *Indian Journal of Science and Technology*, 5:8(2012) 6854-6846.

Please cite this Article as:

Nabil GHEDADBA, Leila HAMBABA, M. C. ABERKANE, S. M. Oueld-Mokhtar, Nassima FERCHA, Houas BOUSSELSA, Évaluation de l'activité hémostatique *in vitro* de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L., **Algerian J. Nat. Products**, 2:2 (2014) 64-74

www.ajnp.webs.com

www.univ-bejaia.dz/ajnp

Online ISSN: 2353-0391

Editor in chief: Prof. Kamel BELHAMEL