

Activité antibactérienne des flavonoïdes d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare* L. de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien)

Ali Boutlelis Djahra¹, Ouahiba Bordjiba¹ & Salah Benkherara¹

¹⁾ Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement, Faculté des Sciences Département de Biologie,
Université Badji Mokhtar BP 12, Annaba 23000, Algérie.

Révisé le 04/09/2011

Accepté le 30/09/2011

ملخص

التداوي بالأعشاب يقترح أدوية طبيعية الذي هو جد مقبول من قبل العضوية و الذي غالبا ما يكون مرفق بأدوية كلاسكية، ويعرف في يومنا هذا تجدد استثنائي عند الغرب. بالإضافة إلى التأثيرات الجانبية التي ترجع إلى أدوية اصطناعية تحبط المستخدمين، ما أدى إلى إتجاههم نحو علاجات أقل ضررا بالنسبة للعضوية. من جانبنا فنحن مهتمين بنوع نباتي مستعمل في التداوي بالأعشاب الذي هو *Marrubium vulgare* L. هدفنا هو البحث عن فعالية هذا النبات على المستوى التطهيري و خاصة النشاط البكتيري ل لفلافونويدات. استخلاص الفلافونويدات سمح بالحصول على مردود جد هام يساوي 5.9%. المركبات المستخلصة تم فصلها بواسطة CCM ونشاطها المضاد للبكتيريا تجاه ستة أنواع بكتيرية مسؤولة عن بعض الأمراض المعدية في وسط اصطناعي. هذه الاختبارات تم مقارنتها مع المضاد الحيوي la Rifampicine الذي ادخل في الاختبارات. النتائج المتحصل عليها بينت ان المستخلص يتكون من مركبين بنسب الجبهة متقاربة نوعا ما، الاختبارات المضادة للبكتيريا للمستخلصات الفلافونويدية أظهرت أن تثبيط تكاثر الانواع البكتيرية يتغير بتغير طبيعة نوع البكتيريا، تركيز المستخلصات ونوع وسط الزرع. تأثير مضاد للبكتيريا مهم لوحظ تجاه الانواع التي تبدي مقاومة تجاه المضادات الحيوية *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و *Staphylococcus aureus*.

الكلمات المفتاحية : نشاط مضاد للبكتيريا - الفلافونويد - *Marrubium vulgare* L. - أنواع متعددة المقاومة.

Résumé

La phytothérapie, proposant des remèdes naturels, est bien acceptée par l'organisme. Elle connaît actuellement un renouveau exceptionnel en occident du fait des effets secondaires induits par les médicaments inquiétant les utilisateurs qui font alors appel à une médecine plus douce. Aussi, notre intérêt s'est porté sur *Marrubium vulgare* L ou Marrube blanc, espèce végétale utilisée en phytothérapie, afin de vérifier l'efficacité de cette plante sur le plan antiseptique et notamment l'activité antibactérienne de ses flavonoïdes. L'extraction des flavonoïdes a donné un rendement assez important égal à 5.9 %. Les composés flavonoïques isolés ont été séparés par CCM et leur activité antibactérienne vis-à-vis de six souches bactériennes responsables de certaines maladies infectieuses a été déterminée *in vitro*. Des tests de comparaison avec un antibiotique, la Rifampicine ont été également inclus dans les essais. Les résultats obtenus révèlent que l'extrait isolé est formé de deux composés ayant des rapports frontaux plus ou moins rapprochés. Les tests antibactériens montrent que l'inhibition de la croissance des souches varie en fonction de la concentration de l'extrait et du milieu de culture utilisé. Un effet antibactérien important a été observé vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et de *Staphylococcus aureus*.

Mots clés : Activité antibactérienne - Flavonoïdes - *Marrubium vulgare* L. - Souches multirésistantes.

Abstract

Herbal medicine, offering natural remedies, is well accepted by the body and often associated with conventional treatments. It now a fantastic revival in the West. In addition, side effects induced by drugs of concern to users, who are turning to less aggressive care for the body. For our part we are interested in a plant species used in herbal medicine, namely *Marrubium vulgare* L or white horehound. Our objective was to verify the efficiency of this plant on the plane including antiseptic and antibacterial activity of these flavonoids. The extraction of flavonoids gave a yield equal to 5.9 %. The isolated compounds were separated by TLC and their antibacterial activity was determined *in vitro* for face six bacterial strains responsible for certain infectious diseases. Comparison tests with an antibiotic, Rifampicin were also included in the trials. The results have demonstrated that the isolated extract is formed from two compounds with frontal reports more or less close. From the antibacterial tests of the isolated flavonic extracts, it appears that the inhibition of growth of the strains tested varies with the nature of the bacterial species, the concentration of the extract and the culture medium used. A significant antibacterial effect was observed for some strains considered among the most resistant to antibiotics such as *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Antibacterial Activity - Flavonoids - *Marrubium vulgare* L. - Multiresistant strains.

Auteur correspondant : djahra_ab@yahoo.fr

1. INTRODUCTION

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires [1, 2]. Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser [3].

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales récentes suggèrent que les composés flavoniques très abondants dans les plantes médicinales et alimentaires possèdent un pouvoir antioxydant et antibactérien remarquable ; ils pourraient ainsi jouer un rôle dans la prévention des maladies infectieuses, cardiovasculaires et cancéreuses [4, 5].

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à une espèce végétale *Marrubium vulgare* L. qui est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement des troubles digestifs, la perte de l'appétit et la dyspepsie [6]. Elle est également employée comme antinociceptif [7], antihypertenseur [8], antispasmodique [9], antioedematogénique [10], analgésique [11], insecticide [12], anti-inflammatoire [13], antimicrobien [14, 15, 16], antioxydant [17], antifongique [18], anti-leucémique [19] et dans de nombreuses autres activités biologiques.

L'objectif de notre présente étude consiste à déterminer l'activité antibactérienne de l'extrait flavonique des feuilles vis-à-vis de six souches bactériennes pathogènes pour l'homme.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel utilisé

Matériel végétal

Le matériel végétal choisi est constitué de feuilles de *Marrubium vulgare* puisque c'est à leur niveau que se trouve la majorité des principales substances actives. L'espèce *Marrubium vulgare* est une plante herbacée vivace blanchâtre très rameux, avec des poils laineux appliqués, des feuilles dentées au sommet, fleurs en petites glomérules à

l'aisselle des paires de feuilles. Une corolle rose pâle et petite par rapport au calice tubuleux, celui-ci s'allonge considérablement à sa partie supérieure en formant autour du fruit une auréole membraneuse [20].

Les feuilles de *Marrubium vulgare* ont été récoltées au moment de la floraison (Décembre 2009) de la région de Chafia (Wilaya d'El Tarf) qui est située au Nord-Est algérien. Elles ont été séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans le présent travail proviennent de trois laboratoires publics et privés de la wilaya d'Annaba. Elles sont largement rencontrées dans diverses pathologies humaines. Elles sont souvent multirésistantes aux antibiotiques et responsables d'infections plus ou moins graves. Il s'agit de :

- *Escherichia coli* 12.
- *Escherichia coli* 1554.
- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- *Proteus mirabilis*.
- *Staphylococcus aureus*.

Milieux de culture

Dans le but de l'évaluation de l'activité antibactérienne des composés flavoniques isolés, nous avons utilisé deux milieux de culture : Mueller-Hinton (MH) et Sabouraud.

Antibiotique

L'antibiotique utilisé est la Rifampicine ou Rifampine, appartenant à la famille des Rifamycines (5 µg) lot : 070531 (sous forme de disques de 6 mm de diamètre). Il est constitué de 50 mg d'isoniazide et de 300 mg de pyrazinamide. Il inhibe l'activité de l'ARN polymérase – ADN dépendante dans les cellules sensibles en interagissant avec l'ARN-polymérase bactérienne.

2.2 Méthodes suivies

2.2.1 Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes consiste à prendre 10 g de feuilles séchées et stabilisées pendant 1 h dans 200 ml d'éthanol à 96°C. Après filtration et séchage, la drogue est pulvérisée grossièrement et épuisée à l'appareil de Soxhlet

par 200 ml d'éthanol à 96°C pendant 4 heures. Après macération de 12 à 24 h, les deux solutions éthanoliques (200 ml+200 ml) sont réunies et évaporées sous pression réduite. Le résidu est repris par 20 ml d'eau bouillante et la solution aqueuse est laissée au repos pendant 24 heures. La liqueur est épuisée successivement dans une ampoule à décantation par (4×10 ml) d'éther, (4×10 ml) d'acétate d'éthyle et (5×10 ml) du n-butanol. L'extrait butanolique est évaporé à l'aide d'un bain de sable à 30°C, le résidu obtenu est récupéré pour l'identification par chromatographie sur couche mince et pour les tests antibactériens.

2.2.2 Séparation des flavonoïdes

Les flavonoïdes extraits ont été séparés par Chromatographie sur Couche Mince (Silica gel 60 F254, support -aluminium, Merck) dont la phase mobile choisie est un mélange d'Acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau (5V/2V/1V). Après révélation, les tâches fluorescentes ont permis de calculer les rapports frontaux. La confirmation de la présence des flavonoïdes est faite par l'ajout de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 2 % dilué dans du méthanol à 95°. Ce dernier provoque en présence des flavonoïdes un changement de couleur des tâches vers le jaune, jaune vert ou ocre.

2.2.3 Activité antimicrobienne

Nous avons utilisé la technique de diffusion sur milieu solide. C'est une méthode similaire

à celle de l'antibiogramme qui consiste à déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs produits. Un disque stérile de papier filtre (Watman n°1) de 6 mm de diamètre est imbibé de produits à tester (flavonoïdes purs, flavonoïdes ½, flavonoïdes ¼), ce dernier est ensuite placé sur de la gélose coulée dans de boîtes de Pétri standard sur 4 mm d'épaisseur et préalablement inoculées avec les souches bactériennes choisies. La concentration de l'inoculum utilisée est de l'ordre de 10⁶ à 10⁸ C.F.U/ml. Les boîtes sont incubées à une température de 37°C pendant 18 à 24 heures. Si le produit est toxique pour l'espèce, il se forme une zone d'inhibition ou un halo transparent autour du disque. Plus grande est cette zone, plus l'espèce est sensible.

Des disques témoins sont inclus dans les essais, Il s'agit de disques imprégnés d'eau distillée stérile et de disques d'antibiotique (la Rifampicine). L'expérimentation a été réalisée en triplicata.

3. RESULTATS

3.1 Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes des feuilles de l'espèce étudiée a donné un rendement de l'ordre de 0.59 g, ce qui correspond à un pourcentage de 5.9 % (Tab. 1).

Tableau 1. Rendement des flavonoïdes des feuilles de *Marrubium vulgare* L.

Echantillon de drogue (g)	Rendement (g)	Pourcentage du rendement (%)
10 g	0.59 g	5.90 %

3.2 Séparation des flavonoïdes

La séparation des flavonoïdes par CCM a révélé la présence de deux tâches ayant des rapports frontaux différents (Tableau 2). Ces

taches soumises à l'action du réactif du chlorure d'aluminium virent vers le jaune et l'ocre.

Tableau 2. Rapports frontaux des tâches et l'action du chlorure d'aluminium (AlCl₃).

Tâche	Rapports frontaux (RF)	Couleur	
		Avant ajout de AlCl ₃	Après ajout de AlCl ₃
Tâche 1	0.64	Brune	Jaune
Tâche 2	0.88	Brune	Ocre

3.3 Activité antimicrobienne

Les résultats des différents tests antibactériens réalisés sur les deux milieux de cultures

(MH et Sabouraud) sont regroupés dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3. Zones d'inhibition (mm) de la croissance des souches bactériennes sur milieu Mueller-Hinton.

Souches	Milieu Mueller-Hinton				
	Flv	Flv ½	Flv ¼	Eau	Rifampicine 5 µg
<i>E.coli</i> 12	38	14	10	00	00
<i>E.coli</i> ATCC 25922	22	12	12	00	12
<i>E.coli</i> 1554	40	38	38	00	54
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	30	34	40	00	42
<i>Proteus mirabilis</i>	32	36	38	00	42
<i>S. aureus</i>	00	12	14	00	12

Tableau 4. Zones d'inhibition (mm) de la croissance des souches bactériennes sur milieu Sabouraud.

Souches	Milieu Sabouraud				
	Flv	Flv ½	Flv ¼	Eau	Rifampicine 5 µg
<i>E.coli</i> 12	38	06	04	00	00
<i>E.coli</i> ATCC 25922	00	02	06	00	08
<i>E.coli</i> 1554	00	02	04	00	44
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	34	40	42	00	52
<i>Proteus mirabilis</i>	38	38	34	00	42
<i>S. aureus</i>	00	04	06	00	44

D'après les tableaux 3 et 4, Il y a une grande hétérogénéité dans les résultats obtenus, l'effet antibactérien est plus ou moins important selon la nature de la souche. D'une manière globale, les flavonoïdes semblent être efficaces vis-à-vis des souches testées.

En ce qui concerne la souche *E.coli* 12 cultivée sur MH, elle s'est révélée plus résistante aux dilutions ½ et ¼ avec 14 et 10 mm contre 38 mm de diamètre en présence des flavonoïdes purs. Des valeurs similaires ont été enregistrées sur le milieu Sabouraud. Ces chiffres sont dans tous les cas meilleurs que ceux obtenus avec la Rifampicine (zone d'inhibition égale à 0 mm).

L'espèce *Proteus mirabilis*, semble très sensible aussi bien aux solutions flavoniques que pour la Rifampicine et ce, dans les deux milieux de culture (zones d'inhibition comprises entre 32 mm et 38 mm).

La souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a montré des zones d'inhibition de 30 à 40 mm de diamètre sur MH et de 34 à 42 mm sur Sabouraud. Le pouvoir antibactérien de

l'extrait sur MH est assez semblable à celui provoqué par l'antibiotique.

Pour ce qui est de la souche *E.coli* ATCC 25922, elle semble plus résistante que les autres souches d'*E.coli*. Les zones d'inhibition ne dépassent pas les 22 mm sur MH et les 6 mm sur Sabouraud. Cette résistance est notée également avec la Rifampicine avec respectivement 12 mm et 8 mm sur MH et Sabouraud.

Quant à la souche *Staphylococcus aureus*, elle semble très résistante aux flavonoïdes purs (00 mm) mais plus sensibles aux autres dilutions (12 et 14 mm sur MH et 4 et 6 mm sur Sabouraud). Presque la même chose a été observée avec la Rifampicine avec un pouvoir antibactérien plus prononcé sur milieu Sabouraud.

La souche *E. coli* 1554 cultivée sur milieu Sabouraud affiche une grande résistance à l'effet des flavonoïdes (00 mm). Cette résistance est moins prononcée sur milieu MH (40 mm). Cependant, elle apparaît affectée

par la Rifampicine dans les deux milieux (44 mm et 54 mm).
 Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches vis-à-vis des produits

testés sur les deux milieux de culture sont mentionnés dans la figure 1.

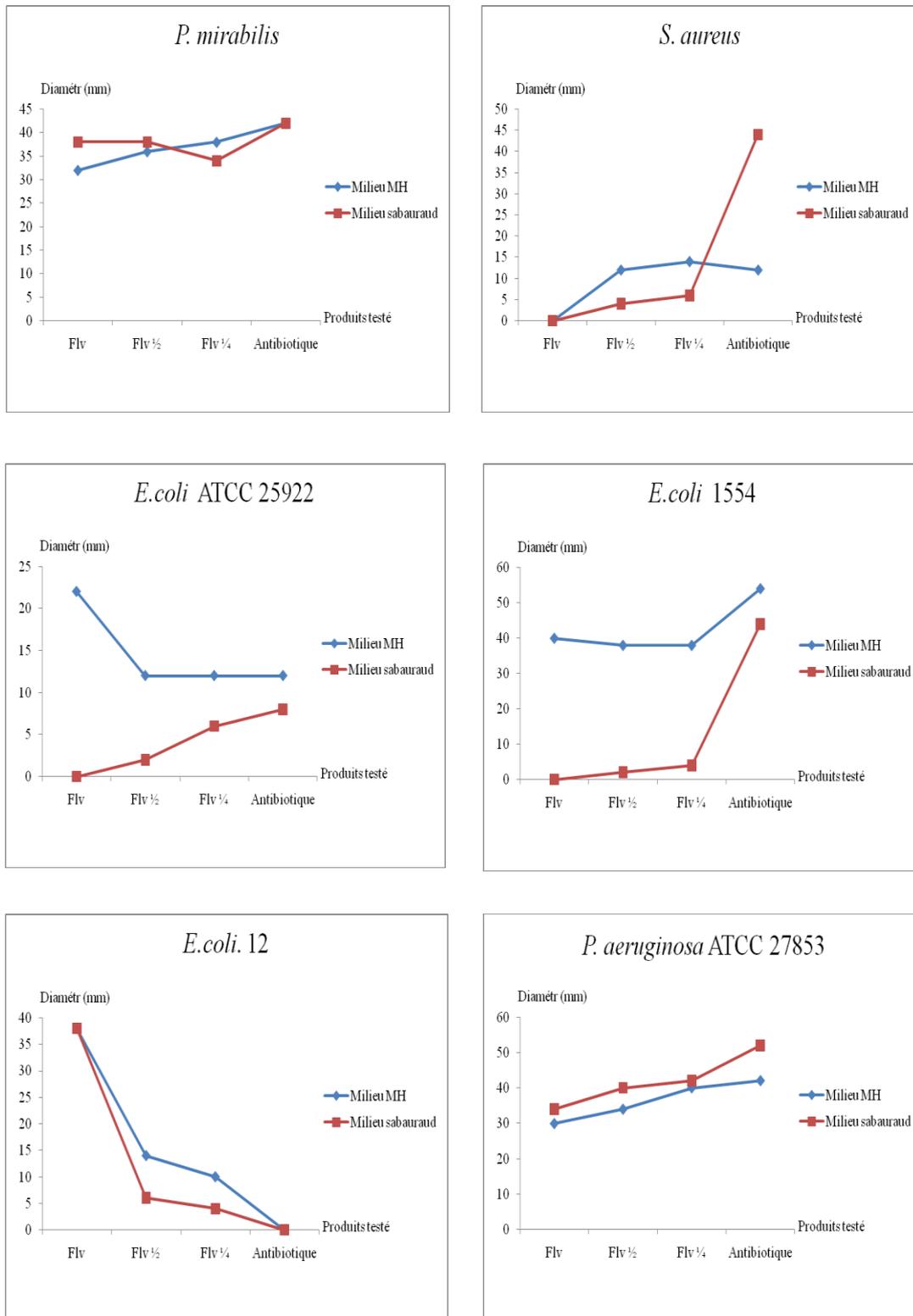


Figure 1. Variation du diamètre des zones d'inhibition de la croissance des souches vis-à-vis des produits testés sur les deux milieux de culture.

4. DISCUSSION

Les teneurs en composés phytochimiques testés varient selon le produit considéré. Ces teneurs peuvent être affectées par le génotype, les conditions du développement et de croissance, la maturité, le conditionnement, les conditions de stockage et par les méthodes d'extraction [21]. Dans le cas présent, ces facteurs ont permis d'avoir une teneur en flavonoïdes de l'ordre de 0.59 g dans les feuilles de l'espèce *Marrubium vulgare*. Ce résultat est largement comparable avec celui de l'espèce *Marrubium peregrinum* dont la teneur des flavonoïdes extraits est de l'ordre de 0.547 g [22].

A partir de la séparation des composés flavonoïques (Tableau 2), les résultats obtenus (rapports frontaux et couleurs des tâches) sont comparables avec ceux enregistrés pour les flavonoïdes extraits des feuilles de *Buxus madagascaria* Bail [23].

D'après la littérature et selon certaines recherches actuelles, il existe une relation étroite entre les composés flavonoïques et les activités antibactériennes [24, 25].

Les extraits flavoniques de *Marrubium vulgare* ont une activité antimicrobienne satisfaisante envers la majorité des souches étudiées.

Les souches *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Proteus mirabilis*, sont les plus sensibles lorsqu'elles sont mises à l'action de ces flavonoïdes sur Sabouraud et MH. Cependant, la souche *E.coli* 1554 est plus résistante sur milieu Sabouraud que sur MH. Parmi les souches testées, seul le *Staphylococcus aureus* a fait preuve d'une grande performance du point de vue résistance face à tous les produits et toutes les concentrations testées.

Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité des extraits des plantes médicinales et leur pouvoir antiseptique qui vient rivaliser celui des antibiotiques. De nombreux travaux soulignent cet effet antibactérien des principes actifs naturels. En effet, Mubashir *et al.* [26] signalent que l'extrait aqueux des feuilles de l'espèce *Marrubium vulgare* exerce une forte activité inhibitrice sur les souches *Staphylococcus aureus* MTCC 740, *Staphylococcus epidermidis* MTCC 435 et une activité de

degré moindre sur *Proteus vulgaris* MTCC 426 et *E.coli* MTCC 443.

Concernant la souche *Proteus mirabilis*, elle s'est révélée très sensible face aux flavonoïdes isolés. Cependant l'auteur d'une étude récemment publiée [27] signale que la souche *Proteus vulgaris* est résistante face à l'extrait méthanolique des feuilles de *Marrubium vulgare*.

La souche *E.coli* ATCC 25922, qui a été dans notre cas, moyennement sensible aux flavonoïdes provenant de l'espèce *Marrubium vulgare* semble très résistante à l'extrait d'éther de pétrole isolé à partir des feuilles de *Marrubium alysson* [18].

L'effet des flavonoïdes de *Marrubium vulgare* sur le germe *Staphylococcus aureus* obtenus dans notre cas est en parfaite concordance avec les travaux antérieurs réalisés à partir de l'extrait de la partie aérienne de *Marrubium catariifolium* [28].

De même, les composants de structure phénolique tels que, Carvacrol, Eugénol et Thymol sont fortement actifs contre les microorganismes et agissent comme des agents dénaturants les protéines [29]. D'autre part, l'activité des huiles essentielles et des extraits des plantes d'Origan et de Laurier montre un pouvoir inhibiteur sur *Pseudomonas aeruginosa* et *E.coli* [30].

Paradoxalement, selon une étude ultérieure, les huiles essentielles de *Marrubium deserti* de Noé ne présentent aucun effet antibactérien sur les germes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 [31].

Les flavonoïdes en raison de leur richesse en groupes phénoliques sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes modifiant ainsi les équilibres enzymatiques [32]. D'autre part, les huiles essentielles de Clou de girofle et d'Origan sont capables d'induire une lyse cellulaire de la bactérie *E.coli*. La lyse des bactéries a été montrée par la libération des substances absorbant à 260 nm. Cette inhibition de développement d'*E.coli* provoquée par ces huiles essentielles est similaire à celle enregistrée par *Marrubium vulgare* [33].

Comme la principale cible de ces composés naturels est la membrane bactérienne des germes ; l'activité biologique de ces composés entraînant une fuite de potassium est la toute première preuve de l'existence de lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Le Thymol et le Carvacrol, composés actifs d'huiles essentielles, rendent perméable la membrane des bactéries qui est un effet précurseur de leur mort [34].

En ce qui concerne l'antibiotique qui a fait l'objet de notre étude (Rifampicine à 5 µg), il a donné des résultats satisfaisants sur la majorité des souches étudiées et particulièrement sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *E.coli* 1554. Ce résultat est en accord avec un travail antérieur où la Rifampicine utilisée à 30 µg a entraîné un effet inhibiteur considérable de la majeure partie des espèces bactériennes expérimentées.

5. CONCLUSION

A travers l'étude de l'activité antibactérienne des composés flavoniques isolés des feuilles de l'espèce *Marrubium vulgare* L. vis-à-vis des souches bactériennes pathogènes et multirésistantes, il apparaît que ces substances possèdent un pouvoir antibactérien important sur les germes testés. L'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce bactérienne, la concentration du produit testé et aussi du milieu de culture utilisé.

D'une manière globale, ces composés semblent efficaces à toutes les concentrations utilisées. De toutes les souches testées, deux d'entre elles se sont montrées très sensibles. Les zones d'inhibition enregistrées sont le plus souvent proches de celles provoquées par l'antibiotique et en particulier celles provoquées sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753 et *Proteus mirabilis*.

Nos résultats confirment que les extraits de *Marrubium vulgare* pourraient probablement rivaliser les produits chimiques synthétiques et les antibiotiques qui sont utilisés dans les traitements des maladies infectieuses. Ces tests contribuent à la validation scientifique de l'usage traditionnel massif, de cette espèce, par les populations. En perspective, il serait important d'approfondir les recherches sur une large gamme de souches microbiennes et d'identifier les constituants actifs responsables de l'activité antibactérienne.

REFERENCES

- [1] Janssen A.M., Scheffer J.J.C. & Svendsen A.B., 1987. Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976-1986 Literature Review. Aspects of the Test Methods, *Planta medica.*, Vol. 53, 395-398.
- [2] Bouzouita N., Kachouri F., Ben Hamdi M., Chaabouni M.M., Ben Aissa R., Zgoulli S., Thonart P., Carlier A., Marlier M. & Lognay G.C., 2005. Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phœnicea*, *J. Essent. Oil Res.*, Vol. 17, 584-585.
- [3] Yano Y., Satomi M. & Oikawa H., 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*, *International J. Food Microbiology.*, Vol. 111, 6-11.
- [4] Johnson I., 1999. Antioxydants et anticancéreux, *Biofutur*, Vol. 186, 14-17.
- [5] Nicoli M.C., Anese M. & Parpinel M., 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables, *J. Trends Food Sci. Technol.*, Vol. 10, 94-100.
- [6] Raynaud J., 2007. Prescription et conseil en phytothérapie. Ed. Tec & Doc. 215p.
- [7] Dejesus R.A., Cechinel-filho V., Oliveira A.E. & Schlemper V., 2000. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*, *Phytomedicine.*, Vol. 7, 111-115.
- [8] El bardai S., Lyoussi B., Wibo M. & Morel N., 2004. Comparative Study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat, *Clin. Exp. Hypertens.*, Vol. 26 (6), 465-474.
- [9] Rigano D., Aviello G., Bruno M., Formisano C., Rosselli S., Capasso R., Senatore F., Izzo A.A. & Borrelli F., 2009. Antispasmodic Effects and Structure-Activity Relationships of Labdane Diterpenoids from *Marrubium globosum ssp. libanoticum*, *J. Nat. Prod.*, Vol. 72, 1477-1481.
- [10] Stulzer H., Tagliari M., Zampirolo J., Cechinel-filho V. & Schlemper V., 2006. Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*, *J. Ethnopharmacol.*, Vol. 108 (3), 379-384.

- [11] Meyre-silva C., Yunes R.A., Schlemper V., Campos-buzzi F. & Cechinel V., 2005. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae), *IL Farmaco.*, Vol. 60 (4), 321-326.
- [12] Pavela R., 2004. Insecticidal activity of certain medicinal plants, *Fitoterapia.*, Vol. 75, 745-749.
- [13] Sahpaz S., Garbacki N., Tits M. & Bailleul F., 2002. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*, *J. Ethnopharmacol.*, Vol. 79 (3), 389-392.
- [14] Rigano D., Formisano C., Basile A., Lavitola A., Senatore F., Rosselli S. & Bruno M., 2006. Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum ssp. libanoticum*, *J. Phytother. Res.*, Vol. 21, 395-397.
- [15] Quave C., Plano L., Pantuso T. & Bennett B., 2008. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Ethnopharmacol.*, Vol. 118 (3), 418-428.
- [16] Warda K., Markouk M., Bekkouche K., Larhsini M., Abbad A., Romane A. & Bouskraoui M., 2009. Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumoniae*, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, Vol. 3 (3), 101-104.
- [17] Weel K.C.G., Venskutonis P.R., Pukalskas A., Gruzdiene D. & Linssen J.P.H., 1999. Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare*) grown in Lithuania, *J. Fett/Lipid.*, Vol. 101 (10), 395-400.
- [18] Edziri H., Ammar S., Groh P., Mahjoub M.A., Mastouri M., Gutmann L., Zine M. & Aouni M., 2007. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Marrubium alysson* and *Retama retama* in Tunisia, *Pak. J. Biol. Sci.*, Vol. 10, 1759-1762.
- [19] Alkhatib R., Joha S., Cheok M., Roumy V., Idziorek T., Preudhomme C., Quesnel B., Sahpaz S., Bailleul F. & Hennebelle T., 2010. Activity of Ladanein on Leukemia Cell Lines and Its Occurrence in *Marrubium vulgare*, *Planta Medica.*, Vol. 76 (1), 86-87.
- [20] Ozenda P., 2004. Flore et végétation du sahara, Ed. CNRS. 662p.
- [21] Zang D. & Hamauru Y., 2003. Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of grebe, red and yellow bell peppers, *J. Food, Agric. Environ.*, Vol. 1, 22-27.
- [22] Stankovic S.M., 2011. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts, *Kragujevac J. Sci.*, Vol. 33, 63-72.
- [23] Razafindrmbao R. S., 1973. Etude d'une Plante Médicinale Malgache *Buxus madagascariensis* Bail et ses variétés, Travaux et Documents de l'ORSTOM n° 25, Paris.
- [24] Bijondi D., Cianci P., Geraci C. & Ruberto G., 1993. Antimicrobial and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants, *Flavour Frag. J.*, Vol. 8, 331-377.
- [25] Jiménez M. & Garcia-Carmona F., 1999. Myricetin, an antioxidant flavonol is a substrate of polyphenol oxidase, *J. Sci. Food Agric.*, Vol. 79 (14), 1993-2000.
- [26] Mubashir H.M., Iqbal Zargar M., Bahar Ahmed A., Saroor A.K., Shamshir K. & Singh P., 2009. Evaluation of Antimicrobial Activity of Aqueous Extract of *Marrubium vulgare* L. *J. Res. Dev.*, Vol. 9, 53-56.
- [27] Kanyonga P.M., Faouzi M.A., Meddah B., Mpona M., Essassi E.M. & Cherrah Y., 2011. Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities, *J. Chem. Pharm. Res.*, Vol. 3 (1), 199-204.
- [28] Uluhanli Z. & Akkaya A., 2011. Antibacterial Activities of *Marrubium catariifolium* and *Phlomis pungens* Var. *Hirta* Grown Wild in Eastern Anatolia, Turkey, *Int. J. Agric. Biol.*, Vol. 13, 105-109.
- [29] Dorman H.J.D., Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil, *Journal of Applied Microbiology.*, Vol. 88, 308-316.
- [30] Ohno T., Kita M., Yamaoka Y., Imamura S., Yamamoto S.M., Kodama T., kashima K., Imanishi J., 2003. Antimicrobial activity of essential oil against *Helicobacter pylori*, *Helicobacter.*, Vol. 8 (3), 207-215.
- [31] Laouer H., Yabrir B., Djeridane A., Yousfi M., Beldovini N. & Lamamra M., 2009. Composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Marrubium deserti* De Noé, *Nat Prod Commun.*, Vol. 4 (8), 1133-1138.

[32] Ozawa T., Lilley T.H. & Haslam E., 1987. Polyphenol interactions: Astringency and the loss of astringency in ripening fruit, *Phytochemistry.*, Vol. 26 (11), 2937-2942.

[33] Burt S.A. & Reinders R.D., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia Coli* 0157, *Letters in Applied Microbiology.*, Vol. 36, 162-167.

[34] Rhayour K., 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat en biologie. Université de Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc. 158p.