

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

Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par

SAFTA Bouchra

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière
Filière : Chimie
Option : **Chimie des Substances Naturelles**

Titre

**Etude analytique et biologique de l'huile essentielle, des
extraits Flavoniques et Tanniques de *globularia alypum L.*
de la région de Blida**

Soutenu publiquement en octobre 2013 devant le jury composé de :

M. El Hattab	Pr	Président	Université de Blida
Y. Daghbouche	Pr	Examinatrice	Université de Blida
H. Boutoumi	MCA	Examinateur	Université de Blida
K. Boutemak	MCB	Promotrice	Université de Blida
N. Ayachi	MAA	Co-promotrice	Université de Blida
N. Bouzidi	MCB	Membre de CP	Université de Blida
S. Kasmi	MCA	Membre de CP	Université de Blida
A. Badis	Pr	Membre de CP	Université de Blida
Z. Chemat	MCB	Membre de CP	Université de Blida
O. Touafak	MCB	Membre de CP	Université de Blida

Promotion 2012-2013

RESUME

Cette étude a été réalisée sur l'une des plantes médicinales : *Globularia alypum* L de la famille des Globulariaceae. L'huile essentielle (HE) de la partie aérienne de la plante extraite par entraînement à la vapeur d'eau, a révélé un rendement moyen de l'ordre de 0.0018%. La détermination de sa composition chimique par CG/MS a montré que cette HE est composé principalement par l'héxadécanoate d'éthyle (35,24%), le Cinnamate d'éthyle (23,80%), l'acide pentadécanoïque, 14-méthyle, méthyle ester (11,01%), le Cinnamate de méthyle (7,05%), le décanoate d'éthyle (5,73%) et 2-Methoxy-4-vinylphenol (1,80%) en dernier.

Les rendements des diverses fractions flavoniques extraites à partir de la partie aérienne de *globularia* par des solvants à polarité croissante : éther diéthylique, acétate et n-butanol. Le meilleur rendement est obtenu avec l'extrait butanolique (l'E-BuOH : 1,96%). L'extrait tannique a donné un rendement de (2,808%). L'estimation quantitative des polyphénols totaux a montré que les tannins présentaient la fraction phénolique la plus élevée avec une teneur ($34,68 \pm 0,29$ mgEAG/g d'extrait) comparativement à celle des flavonoïdes dont l'extrait d'éther diéthylique présentait la fraction phénolique la plus élevée avec une teneur de ($28,86 \pm 1,62$ mgEAG/g d'extrait) et le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de ($873,65 \pm 5,54$ µg EQ/g d'extrait).

L'analyse qualitative par CCM et par HPLC des extraits flavoniques et tannique ont montré que les différents extraits de *globularia alypum* semblent contenir la catéchine et la Rutine et certaines composées polyphénolique

L'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur milieu solide a montré que l'effet antifongique et antibactérien de l'extrait d'éther diéthylique est plus important que celui des autres extraits contre la plupart des souches testées. Par ailleurs, l'HE s'est montré plus sensible vis-à-vis de *S.aureus*.

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant le test au DPPH a montré que les échantillons présentaient un pouvoir réducteur dont l'extrait tannin est le plus actif en tant que piègeur de radicaux libres (IC₅₀ = 0,515 mg/L) suivi par l'E-Ac (IC₅₀ = 0,57 mg/L) et l'E-BUOH (IC₅₀ = 1,11 mg/L), par contre l'HE présentait des capacités de piégeage du radical libre DPPH très faible.

Les activités anti-inflammatoire et antalgique réalisées sur les souris ont montré que la dose de 0.3 g/ml de la fraction butanolique administrés par voie orale présente l'activité la plus importante comparativement aux produits des références l'acide acétylsalicylique et le paracétamol.

Le dosage de quelques éléments minéraux de *globularia* par activation neutronique a montré que l'Arsenic (102.3 µg/Kg) est l'élément le plus abondant, une teneur très élevée en potassium et en sodium (7.24 g/Kg, 353 mg/Kg) suivi des autres éléments Fe (300 µg/g), Zn (12.1 µg/g), Br (6.45 mg/Kg) classés par ordre décroissant.

Mots-clés : *globularia alypum* L, huile essentielle, CG/MS, Tanins, Flavonoïdes, HPLC, antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire, antalgique, NAA.

Abstrat

This study was conducted on one of Medicinal Plants: *GlobulariaaalpumL* family of Globulariaceae. The essential oil (EO) of the aerial part of the plant extracted by steam distillation of water, showed an average yield of about 0.0018%. The determination of the chemical composition by GC / MS showed that HE is mainly composed by hexadecanoicacid,ethyl ester (35,24%) followed by 2-propanoic acid,3phényl,ethyl ester (23,80%),pentadecanoic acid,14methyl,methyl ester (11,01%), 2-propanoic acid,3-phenyl,methyl ester(7,05%) ,decanoic acid ,ethyl ester(5,73%) and last 2-methoxy-4-vinylphenol. (1,80%)

The yield potential of various flavonoid fractions extracted from the aerial part of globular with solvents of increasing polarity: diethyl ether,acetate and n-butanol. The best yield is obtained with the butanol extract (E-BuOH: 1.96%). The tannin extract gave a yield of (2.808%). Quantitative estimation of total polyphenols showed that tannins had the highest phenolic fraction with a contentof (34,68±0,29 mgGAE / g extract) compared to that of flavonoids which diethyl ether extract had the highest phenolic fraction with a grade of (28,86 ± 1,62mgGAE / g of extract) and it's the richest in flavonoids with content of (873,65 ± 5,54QEµg / g of extract).

Qualitative analysis by TLC and HPLC of the flavonoid and tannin extracts showed that different extracts of *globularia alypum* appear to contain catechin and Rutin and some polyphenolic compound.

Evaluation of the antimicrobial activity by the diffusion method on solid showed that the antifungal and antibacterial effect of the extract of diethyl ether is more important than other extracts against most the tested strains. In addition, EO was more sensitive against *S.aureus*.

Evaluation of antioxidant activity using the DPPH test showed that the samples had a reducing power which the extract tannin is the most active as a free radical scavenger (IC50 = 0.515 mg / L) followed by E-Ac (IC50 = 0.57 mg / L) and E-BuOH (IC50 = 1.11 mg / L), by against EO showed a very low capacity of the scavenger of free radical DPPH.

The anti-inflammatory and analgesic activities conducted on mouse have shown that the dose of 0.3 g / ml of butanol fraction administered orally present the most important activity compared with references products aspirin and paracetamol.

The dosage of some minerals in globular by neutron activation showed that arsenic (102.3 ± 9.8µg/Kg) is the most abundant element, a very high content of potassium and sodium (7.24 g / kg, 353 mg / kg) followed by other elements Fe (300 mg / g), Zn (12.1 mg / g), Br (6.45 mg / Kg) in descending order.

Keywords: *globulariaaalpum.L*, essential oil, CG / MS, tannins, flavonoids, HPLC, antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, NAA

ملخص

لقد أجريت هذه الدراسة على واحدة من النباتات الطبية: *LGlobulariaaल्पum* من عائلة *Globulariaceae*، وأظهرت نتائج استخراج الزيوت الأساسية من الجزء الهوائي للنبته بطريقة التقطير ببخار الماء، وجود مردود متوسط يقدر بحوالي 0.0018%. وقد أظهر تقرير التركيب الكيميائي لهذه الزيت الأساسية بواسطة الكروماتوغرافيا (CG-SM) انها تحتوي اساسا على:

l'héxadécanoite d'éthyle (35,24%), Cinnamate d'éthyle (23,80%), l'acide pentadécanoique, 14methyl, méthyle ester (11,01%), Cinnamate de méthyle (7,05%), décanoate d'éthyle (5,73%), 2-Methoxy-4-vinylphenol (1,80%).

اعطى مردود مختلف مستخلصات الفلافونويد المستخرجة من الجزء الهوائي لهذه النبتة عن طريق محاليل ذات قطبية متزايدة: اثيل الأسيئات الأثيروبوتانول حيث مستخلص هذا الأخير اعطى مردود (1.96%)، وقد أعطى استخراج التانين كمية (2.808%). أظهر التقدير الكمي لإجمالي البوليفينول ان النسبة العالية سجلت في مستخلص التان حيث قدرت نتيجته ب (34,68 ± 0,29 ملغ AGE / غرام من مستخلص) بالمقارنة مع مستخلص اثيل الأثير لفلافونويد الذي يمثل المستخلص الغني باليوتيفينول حيث قدر نتيجته ب (28,86 ± 1,62 ملغ AGE / غرام من مستخلص) وهو ايضا يمثل المستخلص الغني بالفلافونويد حيث قدر نتيجته ب (873,65 ± 5,54 ملغ EQ / غرام من مستخلص).

وأظهر التحليل النوعي من قبل CCM وHPLC ان مختلف مستخلصات الفلافونويد و التان تبدو أنها تحتوي على كاتشين وروتين وبعض مركبات بولفنوليك

تم إجراء تقييم لنشاط ضد البكتيريا من خلال طريقة النشر على الوسط الصلب لخلايا جرثومية وأظهرت أن تأثير مضاد للفطريات و مضادة للجراثيم من مستخلص ايثر هو أكثر تأثير من مستخلصات أخرى ضد معظم الجراثيم البكتيرية. أما *Staphylococcus aureus* فقد أظهرت حساسية للزيت .

وأظهر ان النشاط المضادة للأكسدة من خلال طريقة ارجاع الجذر الحر DPPH. نشاطا قويا بالنسبة لمستخلص التانان (IC50 = 0.515 مغ /ل) متنوع بمستخلص الاسات (IC50 = 0.57 مغ /ل) ثم مستخلص البيوتانول (IC50 = 1.11 مغ /ل). اما بالنسبة للزيت الأساسية للنبته فنشاطها جد منخفض.

أظهرت الأنشطة المضادة للالتهابات والمسكنة التي أجريت على الفأر أن الجرعة 0.3 غ / مل من مستخلص البيوتانول الماخوذة عن طريق الفم اصهرت أهم نشاط و ذلك مقارنة مع منتجات المراجع حمض أسيتيل الساليسيليك و الباراسيتامول.

أظهر التحليل المعدني بتقنية التنشيط النيوتروني عن وجود الزرنيخ بوفرة (102.3 مغ /كغ) و وجود نسبة عالية جدا من البوتاسيوم (7.24 غ /كغ) والصوديوم (353 ملغ /كغ) يليهما الحديد (300 ملغ /غ)، الزنك (12.1 ملغ /غ) و البروم (6.45 ملغ /كغ) بترتيب تنازلي.

الكلمات المفتاحية: *L. globulariaaल्पum*، الزيوت الأساسية، CG-SM، التانان، وفلافونيدات. HPLC. ضد الفطريا، ضد

البكتيريا، نشاط مضادات الأكسدة. مصاد الالتهاب. المسكن. NAA.

Remerciement

Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, de m'avoir donné la force et la patience.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à **Mme BOUTEMAK .K**, Maître assistante à la faculté de pharmacie, université SAAD DAHLEB de Blida, ma directrice de Mémoire, que je remercie pour son aide et ses conseils éclairés. Je tiens particulièrement à souligner la qualité remarquable de son encadrement.

J'exprime mon profond remerciement à **Mme AYACHI.N**, Maître assistante à la faculté de Pharmacie, université SAAD DAHLEB de Blida. Merci d'avoir accepté de diriger ce travail au sein du laboratoire de CRD- SAIDAL d'El-Harrach. Merci pour votre encadrement sans faille tout au long de ces trois mois.

Je remercie tous ceux qui vont lire ce mémoire, à commencer par les membres du jury qui ont accepté sans hésitation d'évaluer et de critiquer ce travail:

Mr EL HATTAB.M, Professeur de l'institut de chimie pour l'honneur qu'il m'a fait de présider le jury. Je saisis à l'occasion pour lui remercier pour l'aide qu'il m'a apporté.

Mr BOUTOUMI .H, Maître assistante, à la faculté de chimie, université SAAD DAHLEB de Blida, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour ses précieux conseils.

Mme DAGHBOUCHE.Y, Professeur, à la faculté de chimie, université SAAD DAHLEB de Blida, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire, Je tiens à la remercier pour ses encouragements.

Je remercie **Mme AZINE.K**, directrice de laboratoire de pharmacotoxicologie de CRD El-Harrach, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, mes sincères remerciements se dirigent vers tous les gens de CRD et à **Mr LOUNIS.A** et **Mme AKKACHE.L**.

Je souhaite également exprimer ma sincère gratitude à **Mr. MOUZAI.M**, chargé de recherche au CRND, pour avoir accepté de faire l'analyse par NAA.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance pour tous les enseignants qui ont contribué à ma formation, en particulier : **Mme KASMI .S**, **Mme BOUZIDI.N**, Pour leurs aides et leur encouragement, et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

Je dédie cette Mémoire de Master:

Aux êtres les plus chères à mon cœur, à mes parents qui ont sacrifié toute leur vie pour moi, qui m'ont toujours encouragé dans les moments les plus difficiles et qui ont soutenu ma mémoire de master, fruit de leur éducation et de leur long parcours avec leur fierté depuis ma naissance.

A mes très chère sœurs et frères

(Rabah, Fatah, Nourdine, Yazide, Siham et Sarah)

A mes belles sœurs

(Naima et ghezlène)

A mon beau-frère Kamel « à qui je suis redevable pour toute son aide, sa disponibilité, sa patience tout au long de la réalisation de ce travail ».

Aux petits neveux et nièces

(Abddjalile, islam, dina, sohaib, lyne et maya)

A toute la famille SAFTA

A tous ceux qui me connaissent de près ou de loin sans oublier mes camarades et mes amis et amies.

(Kenza, Hadjer, Asmaa, Khadidja, Sonia, Nassima, Imane, Fatiha, abd e rahmane, Raouf, Elyes, Malek, Mohamad)



BOUCHRA

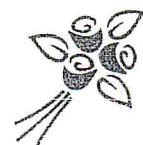


Table des matières

I-Introduction général.....	1
-----------------------------	---

Partie théorique

Chapitre I : étude de l'espèce *Globularia alypum L*

I- Introduction	4
II- Présentation de l'espèce <i>Globularia alypumL</i>	4
II-1-Classification systématique	4
II-2-Nom vernaculaire.....	4
II-3-Description botanique de l'espèce <i>Globularia alypumL</i>	5
III-Répartition géographique et écologique de l'espèce <i>Globularia alypum L</i>	6
VI-Usage traditionnelle de l'espèce <i>Globularia alypum L</i>	6
V-Travaux antérieures déjà réalisés sur l'espèce <i>Globularia alypum L</i>	7
V- 1-Etude chimique de l'espèce <i>Globularia alypum L</i>	7
V - 2-Etude biologique de l'espèce <i>Globularia alypum L</i>	11

Chapitre II : Rappel sur les métabolites secondaires

I- Introduction	14
II- Définition et fonctions des métabolites secondaires.....	14
III- Classification des métabolites secondaires.....	14
III- 1-Les huiles essentielles	14
III- 1-2-Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	15
III- 1-2-a-Entraînement à la vapeur.....	15
III- 1-2-b-Hydro distillation.....	15

III- 1-2-c-Expression à froid.....	15
III- 1-3-Prpriétés biologiques des huiles essentielles.....	15
III- 2-Les composés phénoliques.....	16
III- 2-1-Les flavonoïdes.....	16
III- 2-1-a-Définition.....	16
III- 2-1-b-Structure chimique et biosynthèse des flavonoïdes	16
III- 2-1-c-Classification des flavonoïdes.....	18
III- 2-1-d-Propriétés biologiques des flavonoïdes.....	19
III- 2-2-Les tanins	20
III- 2-2-a-Définition.....	20
III- 2-2-b-Structure chimique et biosynthèse des tanins	20
III- 2-2-c-Classification des tanins	20
III- 2-2-d-Propriétés biologiques des tannins.....	23

Chapitre III : Rappel sur les activités biologiques étudiées

I-L'activitéantioxydante	26
I-1-Définition du stress oxydatif	26
I-2- Les antioxydants	26
I-3- Types d'agents antioxydants	26
II- Activité antibactérienne	26
II- 1-Les infections bactériennes	26
II-2- Les agents antimicrobiens.....	26
II-3- Types d'agents antimicrobiens.....	27
III- L'activité antiinflammatoire.....	27
III-1-Définition de l'inflammation.....	27
III-2- Types d'agents antiinflammatoires.....	27

VI- L'activité antalgique.....	27
VI-1-Définition de la douleur.....	27
VI-2-Types d'agents antalgiques.....	27
Partie expérimentale	13
Chapitre IV : Matériels et Méthodes	
I-Présentation et situation de la zone d'étude.....	29
I-2-Matériel biologique	30
I-2-1- Matériel végétal.....	30
I-2-2-Matériel animal	30
I-2-3- Souches microbiennes.....	31
I-3-Matériel non biologique.....	31
II- Méthodes.....	31
II-1-Détermination du taux d'humidité.....	31
II-2-Extraction des HE au laboratoire.....	32
II-2-4- Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS).....	33
I-3-Tests phytochimiques.....	34
II-3-1-Mise en évidence des flavonoïdes.....	34
II-3-2-Mise en évidence des tanins.....	34
II-4-Extraction des flavonoïdes	35
II-5-Extraction des tanins.....	37
II-6-Analyse qualitative par chromatographique sur couche mince CCM.....	38
II-7-Analyse qualitative par Chromatographie liquide à haute performance HPLC.....	41
II-8-Dosage des polyphénols totaux.....	41

II-9-Dosage des flavonoïdes.....	42
II-10-Dosage des tanins.....	43
II-11-Etude des activités biologiques.....	44
II-11-1-Etude de l'activité antioxydante.....	44
II-11-2-Etude de l'activité antimicrobienne.....	45
II-11-3-Etude de l'activité anti inflammatoire.....	47
II-11-4-Etude de l'activité antalgique.....	51
II-12-Analyse par activation neutronique (NAA).....	51

Chapitre V : Résultats et discussions

I-Détermination du taux d'humidité.....	53
II-Extraction de l'huile essentielle de <i>globularia alypumL</i>	53
II-4-Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de <i>globularia alypum L</i> par (CG/MS).....	55
III-Test phytochimique.....	56
IV-Extraction des flavonoïdes.....	57
V-Extraction des Tanins.....	59
VI- Analyse qualitative des extraits flavoniques et tannique par la chromatographie sur couche mince (CCM).....	60
VII- Analyse qualitative des extrait flavoniques et tannique par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	64
VIII-Dosage des polyphénols totaux	66
IX- Dosage des flavonoides	67
X-Dosage des tanins.....	69
XI- Evaluation des activités biologiques.....	71

XI-1- Evaluation de l'activité anti oxydante	71
XI-2- Evaluation de l'activité antimicrobienne	74
XI-3- Evaluation de l'activité anti inflammatoire.....	77
XI-4- Evaluation de l'activité antalgique.....	80
XII- Analyse de quelques éléments minéraux de <i>globularia alypum L</i> par activation neutronique.....	81
Conclusion et perspective	
Annexe	
références bibliographique	

Liste des abréviations

HE	Huile essentielle
CG/SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse
AFNOR	Association Française de Normalisation
M_{HE}	Masse d'huile essentielle
M_{MV}	Masse de la matière végétale
R	Rendement en huile essentielle
DO	Densité Optique (absorbance).
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
IC50	Concentration inhibitrice de 50%
ZI	Zone d'Inhibition.
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
CCM	Chromatographie sur couches minces
EBr	extrait brut
E-ET	extrait d'éther di éthylique
E-Ac	extrait d'acétate d'éthyle
E-BuOH	extrait 1-butanol
E-T	extrait Tannique
Ag	Acide gallique
At	Acide Tannique
Hyd	Hydroquinone
AB	Acide benzoïque
AS	Acide salicylique
Van	Vanilline
Cou	Coumarine
EAG	équivalent acide gallique

EQ équivalent quercétine

EC équivalent catéchine

Liste des figures

Figure 1 :	<i>Globularia alypum L</i>	Page 5
Figure 2 :	Structure des composés isolés de <i>Globularia alypum L</i>	Page 9
Figure 3 :	Structure de quelques composés isolés à partir de l'extrait hydro alcoolique de <i>Globularia alypum L</i> : (S=syringin, F=flavonoïdes, I=iridoïdes, phenylethanoids)...	Page 10
Figure 4 :	Structure de base des flavonoïdes.....	Page 16
Figure 5 :	Biosynthèse des flavonoïdes.....	Page 17
Figure 6 :	exemple de structure des tannins condensés.....	Page 20
Figure 7 :	exemple de structure d'un tannin condensé.....	Page 21
Figure 8 :	deux exemples de tannins hydrolysables.....	Page 21
Figure 9 :	Biosynthèse des tanins hydrolysables.....	Page 22
Figure 10 :	<i>Globularia alypum L</i>	Page 30
Figure 11 :	Fleur de <i>globularia alypum L</i>	Page 30
Figure 12 :	Montage d'entraînement à la vapeur.....	Page 32
Figure 13 :	Protocole d'extraction des flavonoïdes de <i>globularia alypum L</i>	Page 36
Figure 14 :	Protocole d'extraction des tanins de <i>globularia alypum L</i>	Page 38
Figure 15 :	Schéma représentant l'appareillage et le développement chromatographique d'une plaque.....	Page 39
Figure 16 :	Administration par voie orale de la fraction butanolique de <i>globularia alypum L</i> ..	Page 48
Figure 17 :	Injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de la souris.....	Page 48
Figure 18 :	Injection de l'acide acétique à 1% par voie intra péritonéale	Page 50
Figure 19 :	Evolution du rendement de l'huile essentielle de <i>globularia alypum L</i> en fonction de la durée d'extraction.....	Page 54
Figure 20 :	Huile essentielle de <i>globularia alypum L</i>	Page 54
Figure 21 :	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>globularia alypum L</i>	Page 56
Figure 22 :	mise en évidence des flavonoïdes.....	Page 57
Figure 23 :	mise en évidence des tanins.....	Page 57
Figure 24 :	Extrait E-ET, E-Ac et E-BuOH de <i>globularia alypum L</i>	Page 58

Figure25 :	Rendements (%) en extraits flavoniques étudiés de <i>globularia alypum L</i>	Page 59
Figure26 :	Extrait tannique de <i>globularia alypum L</i>	Page 60
Figure27 :	Chromatogrammes des extraits (flavoniques : E-ET, E-Ac , E-BuOH et tannique : E-T) de <i>globularia alypum L</i> après la révélation chimique par H ₂ SO ₄ ..	Page 61
Figure28:	Chromatogrammes des extraits (flavoniques : E-ET, E-Ac , E-BuOH et tannique : E-T) de <i>globularia alypum L</i> après la révélation par l'UV.....	Page 61
Figure29 :	Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	Page 66
Figure30 :	Droite d'étalonnage de la quercétine.....	Page 68
Figure31:	teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits flavoniques.....	Page 69
Figure32 :	Droite d'étalonnage de la catéchine.....	Page 69
Figure33 :	teneur en polyphénols totaux et en Tanins d'extrait Tannique.....	Page 70
Figure34 :	pourcentage d'inhibition de DPPH par les différentes fractions flavoniques.....	Page 71
Figure35 :	pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait Tannique.....	Page 71
Figure36:	Les IC ₅₀ des différents extraits de <i>globularia alypumL</i> et de l'acide ascorbique..	Page 72
Figure37 :	pourcentage d'inhibition de DPPH par l'huile essentielle.....	Page 73
Figure38 :	Diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes par les extraits actifs de <i>globularia alypum L</i>	Page 77

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Concentration des composés phénoliques totaux dans l'extrait hydro alcoolique de la partie aérienne de <i>globularia alypum</i>	Page 8
Tableau 2 :	Concentration des composés phénoliques, flavonoïdes totaux dans l'extrait hydroéthanolique de <i>globularia alypum</i>	Page 8
Tableau 3 :	Concentration des composés phénoliques, flavonoïdes et anthocyanes totaux dans les différents extraits de feuilles de <i>globularia alypum</i>	Page 8
Tableau 4 :	Concentration des composés phénoliques, flavonoïdes et anthocyanes totaux dans l'extrait hydroéthanolique de feuilles de <i>globularia alypum</i>	Page 9
Tableau 5 :	caractéristiques de souches microbiennes utilisées.....	Page 31
Tableau 6 :	Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de <i>globularia alypum</i> L	Page 54
Tableau 7 :	Composition chimique de l'HE de <i>globularia alypum</i> L.....	Page 55
Tableau 8 :	Aspects, couleurs et rendements des diverses fractions flavoniques extraites à partir de la partie aérienne de <i>globularia alypum</i> L en pourcentage par rapport à 100 g de matériel végétal sec.....	Page 58
Tableau 9 :	Aspects, couleurs et rendements de l'extrait tannique de la partie aérienne de <i>globularia alypum</i> L en pourcentage par rapport à 2,5 g de matériel végétal sec.....	Page 59
Tableau 10 :	comportement chromatographique des extraits des extraits flavoniques de : E-ET, E-Ac , E-BuOH et extrait tannique : E-T de <i>globularia alypum</i> L.....	Page 62
Tableau 11 :	comportement chromatographique des étalons : Ag, At, Hyd , AB, AS, Van , Cou.....	Page 63
Tableau 12 :	La relation entre la fluorescence et la nature de produit flavoniques.....	Page 64
Tableau 13 :	Temps de rétention des témoins.....	Page 65
Tableau 14 :	Temps de rétention des différents extraits obtenus par la séparation avec HPLC.....	Page 65
Tableau 15 :	Les teneurs en polyphénols totaux dans les différents fractions de <i>globularia alypum</i> L (exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique /poids de l'extrait).....	Page 66

Tableau 16 :	les Teneurs en flavonoïdes totaux exprimées en $\mu\text{g EQ/g}$ d'extrait (moyenne des trois mesures).....	Page 67
Tableau 17 :	Teneurs en Tanins exprimées en mg EC/g d'extrait (moyenne des trois mesures).....	Page 69
Tableau 18 :	valeurs des IC50 établies pour chaque extrait ainsi que celle de l'acide ascorbique.....	Page 72
Tableau 19 :	diamètre des zones d'inhibition des fractions des extraits flavoniques : l'EET, l'EAc ,BuOH ,d'extrait tannique E-T et d'HE .de <i>globularia alypumL</i> (mm)....	Page 75
Tableau 20 :	Moyennes des poids entre la patte gauche et droite des souris.....	Page 78
Tableau 21 :	Pourcentage de l'œdème et le pourcentage de réduction de l'œdème.....	Page 79
Tableau22 :	Nombre de crampes/ souris observé pendant 10 min, et le pourcentage de réduction de crampes.....	Page 80
Tableau 23 :	fraction massique des éléments identifiés chez <i>globularia alypum L</i>	Page 81

INTRODUCTION

Introduction

Pendant des siècles, l'Homme s'est toujours soigné par les plantes, de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes [1] où les plantes étaient l'une des seules sources de guérisons des maladies à cette époque [2]. La phytothérapie prend ses racines dans la science et la sagesse des premiers humains qui ont repéré les plantes qui avaient des effets bénéfiques sur leurs organismes [3], en effet une plante est dite médicinale lorsqu'elle possède au moins des propriétés médicamenteuses [4]. Les plantes médicinales sont à la fois, un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention de substances actives. [5]. L'isolement de principes actifs date du XIX^{ème} siècle, en améliorant la connaissance des structures, a fait progressivement se séparer et parfois s'opposer à une phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue. Cette thérapeutique officielle accepte parfois avec une certaine méfiance l'emploi de végétaux ou d'extraits complexes de végétaux dont l'action est confirmée par l'usage sans être attribuée de façon certaine à une molécule type [6].

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires [6] tels que : les polyphénols qui font l'objet de nombreuses recherches et qui jouent un rôle très important dans la prévention des maladies dégénératives. Ce groupe de produits naturels est très diversifié et comprend plusieurs sous-groupes en particulier les flavonoïdes et les tanins [7].

La plupart des végétaux renferment des huiles essentielles qui sont une autre classe importante de métabolites secondaires de composition chimique généralement assez complexe, renfermant des principes odorants volatils contenus dans ces végétaux [1] où l'utilisation des huiles essentielles (HE) est une tradition très ancienne [8].

Afin de contribuer à une meilleure connaissance de notre patrimoine naturel en plantes aromatiques et médicinales (PAM), nous allons dans ce travail, étudier une des espèces de la famille des globulariacées : *globularia alypum.L*, (nom français= globulaire, nom vernaculaire = Teselgha). C'est une espèce vivace, rencontrée dans les garrigues et les forêts,

très utilisée en médecine traditionnelle pour ces nombreuses propriétés : anti-inflammatoire, anti-ulcère, antidiabétique, anti-oxydante et myorelaxante.

Ainsi, l'objectif de ce travail se résume à l'étude et l'extraction des (huiles essentielles, flavonoïdes et tanins) qui ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires et qui peuvent être à l'origine des vertus thérapeutiques de cette plante. Dans cette optique et dans le but de valoriser cette plante « la globulaire », nous avons structuré le travail comme suit :

La première partie est une étude bibliographique dans laquelle, on présentera la matière végétale, son utilisation et les différents travaux dont elle a fait l'objet, des généralités sur les huiles essentielles, les flavonoïdes et les tanins et un petit rappel sur des activités biologiques.

La seconde partie est une étude expérimentale qui sera consacrée à :

- L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de *globularia alypum L* par entraînement à la vapeur d'eau.
- La caractérisation physico-chimique et organoleptique de cette huile essentielle.
- La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *globularia alypum L* par CG/SM.
- L'extraction et l'identification des flavonoïdes et des Tanins par CCM et par HPLC.
- L'étude du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle et des contenus flavoniques et Tanniques de la *globularia alypum L*.
- L'étude du pouvoir antioxydant de l'huile essentielle et des contenus flavoniques et Tannique de la *globularia alypum L*.
- L'étude de pouvoir anti-inflammatoire de la fraction butanolique de l'extrait flavonique de *globularia alypum L*.
- L'étude de pouvoir antalgique de la fraction butanolique de l'extrait flavonique de *globularia alypum L*.
- Dosage de quelques éléments minéraux chez la *globularia alypum L* par la technique d'analyse par activation neutronique.

A partir de l'interprétation des résultats expérimentaux nous aboutirons à une conclusion générale qui nous permettra d'avoir des perspectives liées à ce travail.

Chapitre I

Etude de l'espèce
Globularia alypum

I- Introduction

La famille des *Globulariacées* est une famille de plantes dicotylédones qui comprend environ trente espèces répandues en Europe et le nord-africain répartie en deux genres : *globularia* et *poskea*[9]. Les plantes du genre *Globularia* sont des herbes ou des arbustes [10] bien connus dans les régions méditerranéennes pour leurs propriétés biologiques [11] comme étant une riche source de composés phénoliques [10]. Des études confirment que les espèces du genre *globularia* présentent des activités antimicrobiennes, cytotoxiques, anti-oxydantes et anti-inflammatoires [9].

Parmi les plantes de ce genre, il existe « *globularia alypum. L* » qui est une espèce largement distribuée dans la région méditerranéenne, connue pour ses utilisations dans la médecine populaire pour plusieurs propriétés: traitement des rhumatismes, la fièvre typhoïde, la fièvre intermittente, le diabète et aussi comme laxatif efficace. La plante possède aussi d'autres propriétés telles que : anti-leucémique, immunosuppresseur, anti-ulcère, hypoglycémique, anti-oxydante, myorelaxante et spasmolytiques [12].

II- Présentation de L'espèce *Globularia alypum*L

II-1- Classification systématique [9]

Embranchement : *Angiosperme*.

Classe : *Dicotylédone*.

Sous Classe : *Asteridae*.

Ordre : *Scrophulariales*.

Famille : *Globulariaceae*.

Genre : *Globularia*.

Espèce : *Globularia alypum*.

II- 2-Nom vernaculaire

- Français : Globulaire, séné sauvage [13]
- Anglais : Three-tooth'd-Globularia [14].

- Maroc : Einlarneb [15].
- Tunisie : zriga [10]
- Algérie : Tasselgha [16], chelgha, zerga [16,13].

II-3-Description botanique de l'espèce *Globularia alypum*L

L'espèce *Globularia alypum* est un petit arbuste de couleur glauque rameux d'environ 30 à 60 cm de hauteur [13] ses petites feuilles sont persistantes de 1 à 4 cm, alternes simples entières où à 3 dents, longues avec un court pétiole, coriace, ponctuées de petites taches brillantes sur les deux faces, régulièrement espacées sur les rameaux longs, groupées sur les rameaux courts [17]. Ses petites Fleurs atteignant près de 2 cm de diamètre et disposées le long et au sommet des tiges, ayant la lèvre supérieure très courte à l'inférieure, d'une couleur bleu violacé [9]. Ces fleurs sont odorantes tout l'hiver et au printemps [17]. C'est l'une des plus belles fleurs hivernales des garrigues [18].



Figure 1 :*Globularia alypum*L [9].

III- Répartition géographique et écologique de l'espèce *Globularia alypum L*

Le genre *Globularia* est commun dans les régions méditerranéennes, dans le sud de l'Europe et dans l'Afrique du Nord (Tunisie, Maroc, Libye et Algérie) [10]. L'espèce *globularia alypum* est largement répandue en Algérie. Elle se trouve répartie dans l'atlas saharien, dans le Hoggar en altitude, en terrain rocailleux, dans les garrigues et les forêts d'Algérie [13]. La période de floraison présente la saison allant de l'hiver jusqu'au début du printemps (janvier à avril) [14].

VI- Usage médicinal de l'espèce *Globularia alypum L*

Globularia alypum L. est une plante aromatique et médicinale, très connue par les habitants du Maghreb. Elle est largement utilisée et réputée pour ses vertus thérapeutiques [19].

- En Algérie, cette espèce est utilisée en médecine traditionnelle autant que purgatif, cholagogue, stimulante, antiseptique, hypoglycémiante, laxatif, sédatif, stomachique. Elle est aussi utilisée pour le traitement de la constipation [16]. Elle est connue pour ses propriétés digestives [19]. Elle est employée comme agent purgative, sudorifique et pour le traitement des maladies cardiovasculaires et rénales [20].
- En Tunisie, cette plante est utilisée pour le traitement des maladies de la peau, notamment l'eczéma. Elle est aussi utilisée pour le traitement des troubles digestifs, pour calmer les douleurs intestinales, l'hypertension artérielle, les problèmes cardiovasculaires, le diabète et la colique néphrétique [20].
- Quant à La médecine traditionnelle marocaine ; cette espèce est employée pour ses propriétés : laxatif, cholagogue, sudorifique, purgative, fébrifuge [15] et elle est aussi utilisée pour le traitement des troubles gastro-intestinaux [21].

V- Travaux antérieurs déjà réalisés sur l'espèce *Globularia alypum* L.

Plusieurs travaux de recherche ont été réalisés sur cette espèce dont parmi eux nous citons :

V- 1-Etude chimique de l'espèce *Globularia alypum* L.

L'étude chimique des extraits de différentes parties de la plante de *globularia alypum* a permis l'isolement des différents composés en particulier les acides phénoliques, les flavonoïdes et les iridoïdes ainsi que d'autres composés dont nous pouvons citer les travaux suivants :

- En 1933, les travaux de Sanchez [9] ont permis d'isoler à partir de *Globularia alypum* l'acide cinnamique et l'acide protocatéchique.
- En 1974, P.Bernard[22] a étudié les extraits à partir des feuilles du globulaire originaire de la France où il a isolé les composés suivants : globularine, catalpol, rutine, luteoline 7-glucoside, acide cinnamique, acide caféique, acide ferulique, acide p-coumarique, acide chlorogénique.
- En 1981, R.K. Chaudhuri[23] a étudié la plante entière de cette espèce récoltée en Suisse où il a isolé les produits suivants: globularimine, globularinine, globularidine, globularicisine ; globularine, catalpol, liriodendrine, syringine.
- En 1982, B.Benhassine[24] a étudié la partie entière de la plante cueillie en Tunisie où il a identifié les composés suivants : 4',7-dihydroxyflavone ; apigénine-7-gucoside ; quercétol, luteoline-7-glucoside, 8-C-glucosyl-4',7-dihydroxyflavone, rutoside ; cyanidine, peonidine, acide vanillique, acide syringique, acide caféique, acide sinapique, acide p-coumarique, acide ferulique, acide b-resorcylique.
- En 2004, P.Stoker et coll[25] ont étudié l'extrait hydro alcoolique de la partie aérienne de *G. alypum* provenant de l'Algérie où ils ont déterminé la teneur des poly phénols (tableau 1). L'analyse par HPLC de cet extrait a permis de mettre en évidence des composés phénoliques provenant de l'acide cinnamique et de ses dérivés.

Tableau 1 : Concentration des composés phénoliques totaux dans l'extrait hydro alcoolique de la partie aérienne de *globularia alypum L.*

Extrait de <i>G.alypum L</i>	Concentration
Phénols totaux (mg EQ/100g matière sèche)	1915

- En 2006, A.Djeridane et coll [26] ont démontré que cette plante soit classée parmi les espèces ayant des teneurs élevés en composés phénoliques. La teneur des polyphénols et des flavonoïdes sont représentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Concentration des composés phénoliques, flavonoïdes totaux dans l'extrait hydroéthanolique de *globularia alypum L.*

Extrait de <i>G.alypum L</i>	Concentration
Phénols totaux (mg EAG/g matière sèche)	21.54 ± 0.81
Flavonoïdes (mg EQ /g matières sèche)	4.54 ± 0.09

- En 2006, Nour-Eddine Es-Safi et coll [27] ont isolé les composés chimiques suivants: les flavonoïdes (composés F1 à F4), les phenyl ethanoides (composés P1 à P4) et les iridoïdes (composé I1 a I6) ainsi que la syringine (figure 3) à partir de l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne.
- En 2011, Daycem Khelifi et coll [10] ont étudié les extraits à partir des feuilles de *Globularia alypum L.* en utilisant différents solvants et ils ont calculé les rendements et les teneurs en poly phénols, les tanins, les anthocyanes et les flavonoïdes (tableau 3).

Tableau 3 : Concentration des composés phénoliques, des flavonoïdes et des anthocyanes totaux dans les différents extraits des feuilles de *globularia alypum L.*

échantillons	Rendement%	Polyphenols (EAG) g/Kg	Tannins (EC) g/Kg	Flavonoides (EQ) g/Kg	Anthocyanes (EG C3) g/Kg
Méthode(#1)					
Méthanol(75%)	42.4	116.89 ± 2.80	1.40 ± 0.06	18.20 ± 0.25	8.17 ± 0.70
L'éther de pétrole	15.6	8.50 ± 0.10	5.73 ± 0.06	0.31 ± 0.02	/
dichlorométhane	2.4	41.19 ± 1.33	18.65 ± 0.11	0.34 ± 0.02	/
Méthode(#2)					
Acétone	12.9	109.46 ± 1.1	2.79 ± 0.07	17.08 ± 0.35	70.69 ± 1.53
Méthanol(75%)	37	139.95 ± 3.40	2.33 ± 0.06	19.29 ± 0.04	36.5 ± 2.01
L'eau	1.1	55.10 ± 2.30	4.40 ± 0.06	1.33 ± 0.02	28.49 ± 3.55

- En 2012, Riadh Ben Mansour et coll[20] ont effectué des recherches sur les extraits hydroéthanoliques préparés à partir des feuilles de *Globularia alypum*. Dans un premier temps, ils ont déterminé la teneur en poly phénols, en flavonoïdes et en anthocyanes (tableau 4). Ensuite, ils ont isolés à partir de l'extrait hydrométhanolique de la tige et des feuilles, des nouvelles composés phénoliques tels que: hydroxyluteolin 6-7-O-laminaribioside, ériodictyol 7-O-sophorosides et 6'-O-coumaroyl-1'-O-[2 - (3,4-dihydroxyphényl) éthyle]-β-D-glucopyranoside et deux glycosides flavonoïdes identifiés comme hydroxyluteolin 6 -7-O-β-D-glucopyranoside et la lutéoline 7-O-sophoroside.

Tableau 4 : Concentration des composés phénoliques, flavonoïdes et anthocyanes totaux dans l'extrait hydro éthanolique des feuilles de *globularia alypum L*.

Extraits de G.alypum (feuilles)	Concentration
Phénols totaux (mg EAG/g matière sèche)	247,24 ± 5,09
Flavonoïdes (mgEQ /g matières sèche)	78,82 ± 2,09
Anthocyanes (mg E Cy-3-glu /g matière sèche)	0,53 ± 0,12

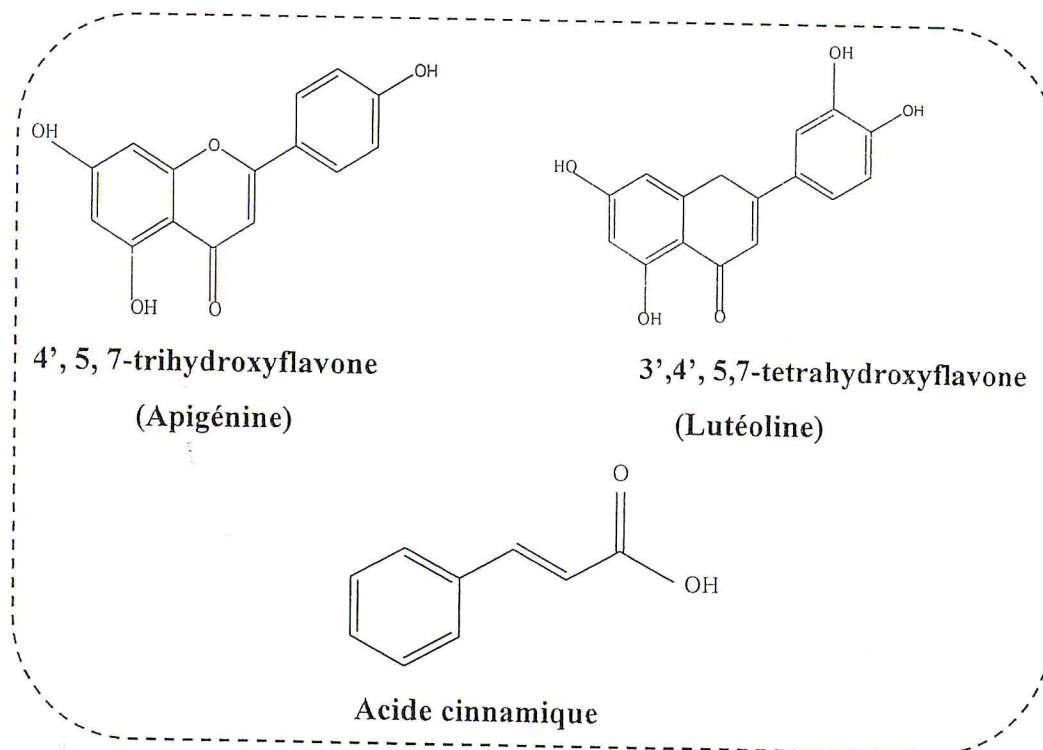


Figure 2 : Structure des composés isolés de *Globularia alypum L* [9].

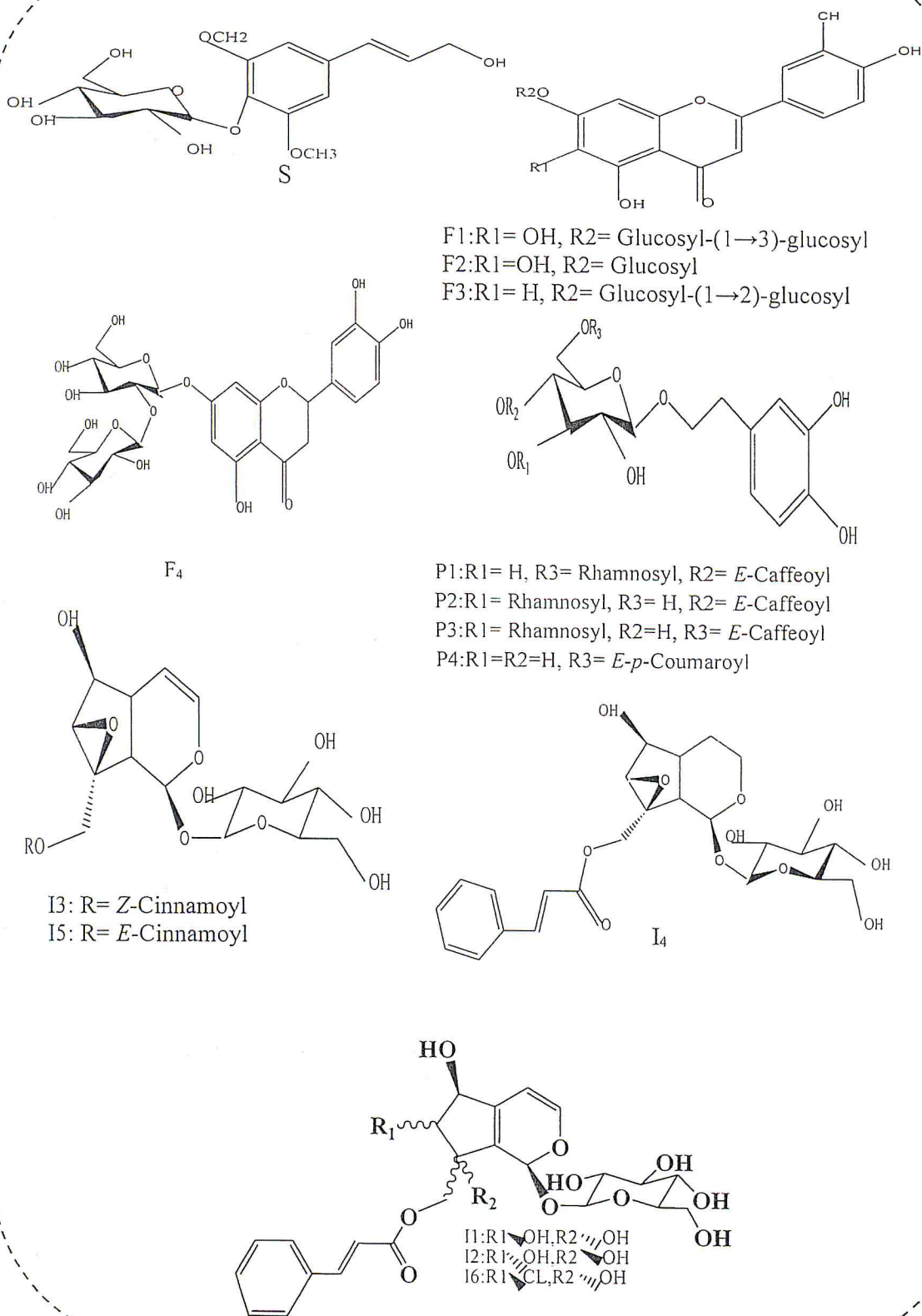


Figure 3 : Structure de quelques composés isolés à partir de l'extrait hydro alcoolique de *globularia alypum L*: (S = syringines, F = flavonoïdes, I = iridoïdes, P = phenylethanoides) [27].

V-2-Etude des activités biologiques de l'espèce *Globularia alypum* L

Les extraits préparés à partir des différentes parties de la plante de *globularia alypum* ont été étudié pour leurs activités biologiques telles que l'activité hypoglycémiant, l'activité antibactérienne et l'activité antioxydante dont nous pouvons citer les travaux suivants :

- En 1999, F.skim et coll [28] ont étudié l'activité hypoglycémiant de cette espèce chez les rats. L'administration orale de l'infusion préparée à partir des feuilles a donné un effet significatif d'hypoglycémie dans des conditions normales ainsi que chez les rats hyperglycémiant. L'infusion augmente de manière significative le taux d'insuline plasmatique chez le rat normal. Il a été suggéré que l'activité hypoglycémiant de cette plante peut être méditée par l'amélioration du métabolisme périphérique du glucose et l'augmentation de la sécrétion d'insuline.
- L'activité antioxydante a été aussi confirmée par les travaux de Nour-Eddine Es-Safi et coll. en 2006 [27] sur Les extraits hydroalcooliques préparés à partir de la partie aérienne en utilisant la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Cette activité a été réalisée sur les composés isolés (S = syringin, F = flavonoids, I = iridoids, P = phenylethanoids) (figure3) dont les résultats montrent que les composés flavoniques testés pour leur capacité à piéger le radical DPPH présentaient une activité plus puissante par rapport à tous les composés testés ; tandis que les iridoïdes et la syringine montraient une faible activité antioxydante.
- En 2011, Daycem Khlifi et coll [10] ont étudié l'activité anti-oxydante de cette plante sur les extraits préparés à partir des feuilles à l'aide des tests de piégeage des radicaux libres (DPPH et ABTS). Ils ont déduits que les extraits préparés à partir des solvants de polarité élevée présentaient une meilleure activité antioxydante que les extraits préparés à partir de solvants de faible polarité. Ils ont aussi étudié l'activité anti-tuberculose contre *Mycobacterium tuberculosis* où ils ont trouvé une corrélation positive entre la teneur totale en composés phénoliques et les activités étudiées.
- En 2012, Riad Ben Mansour et coll [20] ont étudié l'activité antioxydante de l'extrait hydroéthanolique des feuilles à l'aide des tests de (DPPH, ABTS). D'autre part ils ont étudié l'effet cytotoxique de l'extrait hydroéthanolique sur les cellules HeLa à l'aide de test MTT(3 - (4,5-diméthylthiazolyl-2) -2,5-diphényltétrazolium bromure) (test de

reproduction cellulaire) où les résultats ont montré que l'extrait présentait un effet cytotoxique .

- En 2011 Nawal Taleb-Dida et coll [29] ont étudié l'hypertriglycéridémie et le statut oxydatif du muscle, des reins et du cœur chez les rats. L'administration de l'extrait aqueux de cette espèce a permis de réduire les troubles du métabolisme et du stress oxydatif induit chez les rats nourris avec un régime riche en fructose. Ils ont conclu que l'extrait offrait une perspective prometteuse pour le traitement de l'hypertriglycéridémie. En outre, dans le muscle et dans les reins, l'extrait aqueux du *globularia alypum* a permis de réduire la peroxydation lipidique et a amélioré les enzymes anti oxydantes.
- En 2012, F. Bouabdelli et coll [16] ont étudié l'activité antibactérienne des extraits obtenus par infusion, décoction, macération et percolation de plusieurs espèces végétales algériennes parmi eux, l'espèce *globularia alypum L.* Ils ont trouvé une zone d'inhibition de diamètre qui varie entre 8 mm et 15 mm pour la plupart des plantes étudiées. Ils ont conclu que ces plantes sont potentiellement une bonne source d'agents antibactériens, ce qui montre leurs importances dans la médecine alternative dans l'ouest d'Algérie.

Chapitre II

Rappel sur les métabolites secondaires

I- Introduction

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse des principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires [30].

II- Définition et fonctions des métabolites secondaires

Le métabolisme secondaire, désignant un métabolisme dont la distribution taxonomique serait limitée et dont la contribution au fonctionnement cellulaire ou au développement des plantes serait insignifiante [31].

Les métabolites secondaires ne sont pas vitaux pour l'organisme mais jouent nécessairement un rôle important dans la machinerie enzymatique complexe nécessaire à leur production. Ils ont des rôles écologiques. Ces molécules furent sélectionnées au cours de l'évolution pour l'interaction qu'elles ont avec un récepteur d'un autre organisme. Elles représentent donc une grande source potentielle d'agents thérapeutiques [30]. Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores et dans les relations entre les plantes et leur environnement [31].

III- Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes (exp : Les iridoïdes), les alcaloïdes, les huiles essentielles et les polyphénols, dont on distingue les principales classes :

III- 1-Les huiles essentielles

III- 1-1-définition

Les huiles essentielles sont des produits volatils huileux odoriférants extraits des végétaux. Depuis Février 1998, la norme AFNOR NF T 75- 006 a donné la définition d'une huile essentielle comme : « Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des Citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques» [32,33].

III- 1-2-Procédés d'extraction des huiles essentielles

III- 1-2-a-Entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau est la méthode la plus utilisée pour récupérer les huiles essentielles, elle représente 80% de la récupération des huiles. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal : les feuilles, les racines ou les fleurs sont soumis à l'action d'un flux de vapeur au bas d'une charge végétale. La vapeur chargée en huile essentielle est condensée avant d'être décantée et récupérée dans un essencier ou un vase florentin, on obtiendra donc d'un côté les huiles essentielles et de l'autre l'eau florale [32].

III- 1-2-b-Hydro distillation

L'hydrodistillation est la méthode normée pour l'extraction des huiles essentielles dont le principe correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Il est ensuite refroidi et condensé dans un essencier ou vase florentin [34].

III- 1-2-c-Expression à froid

Cette méthode n'est utilisée que pour les épicarpes des Citrus (citrus limonum, Citrus sinensis...) [35]. Le principe de la méthode est très simple : Les « zestes » sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices qui ont été rompues est récupéré par un procédé physique [4].

III- 1-3- Propriétés biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont dotées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles ont des propriétés antitoxiques, antivirales, anti-oxydantes et antiparasitaires. Plus récemment, les recherches reconnaissent des propriétés anticancéreuses [36]. L'activité biologique d'une HE est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son «Totum»; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires [37, 38].

III- 2-Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires qui constituent l'un des groupes le plus nombreux et largement distribué dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate [39]. L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) [4]. On distingue deux grandes classes de des polyphénols les flavonoïdes et les tanins.

III- 2-1-Les flavonoïdes

III- 2-1-a-Définition

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ce groupe comprend comme son nom l'indique des composés jaunes mais aussi d'autres couleurs ou incolores. Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal. Les flavanoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universel [40, 41].

III- 2-1-b-Structure chimique et biosynthèse des flavonoïdes

▪ Structure

Les flavonoïdes identifiés ont une origine biosynthétique commune et de ce fait présentent le même élément structural de base (sauf exceptions : chalcones, aurones, isoflavones), à savoir quinze atomes de carbone arrangés comme suit : C6-C3-C6. Constitués de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (noyau 2-phényl-1-benzopyrane) (Figure 4) [4].

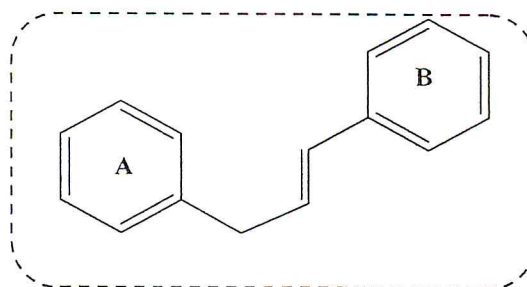


Figure 4: Structure de base des flavonoïdes

▪ Biosynthèse

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie mixte shikimate/polyacétate [4]. La voie biosynthétique est présentée dans (figure 5)

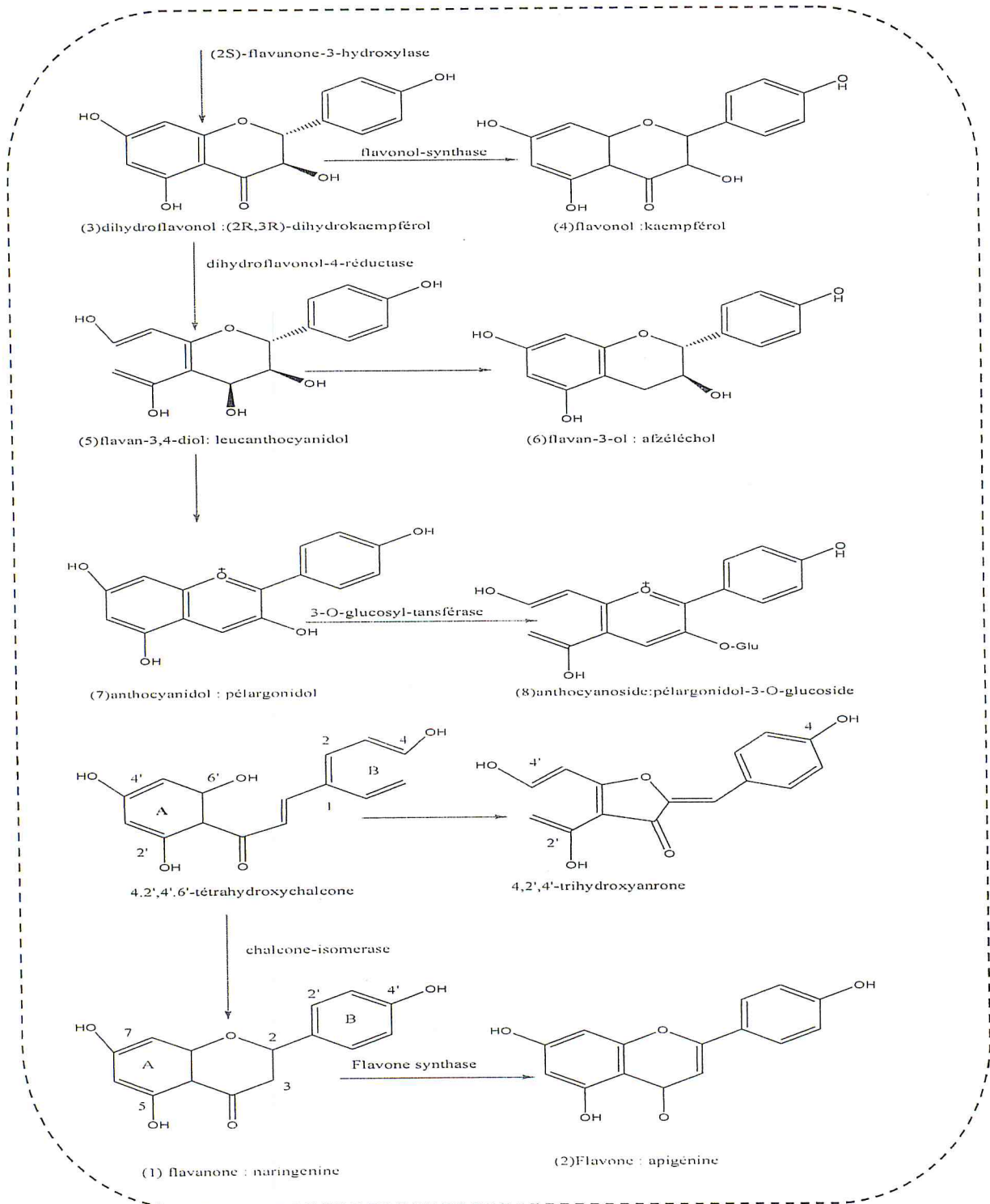


Figure 5 : Biosynthèse des flavonoïdes.

III- 2-1-c-Classification des flavonoïdes

Les principaux groupes de flavonoïdes peuvent être définis et différenciés comme suit :

- **Flavones et flavonols**

Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et en C7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B est substitué en C4' ou di-substitué en C3' et C4' par des groupements OH ou méthoxyles (OCH₃). Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C3 [42].

- **Flavanones et hydroflavonols**

Se caractérisent par l'absence de la double liaison entre le C2 et le C3 et par la présence des centres d'asymétrie. Les variations structurales sont ici de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C3 [43].

- **Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols**

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4. Cette position peut être libre (flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (flavan-3,4-diols). Les anthocyanosides sont caractérisés par l'engagement de l'OH en C3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le palargonidol-3,4-O-glucoside et lecyamidol-3-O-rutinoside ou keracyanine [4].

Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés [4].

- **Chalcones et aurones**

Les chalcones ont leur noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique et insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le 17 cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones sont caractérisés par une structure de 2-benzylidène coumarone [4,43].

III- 2-1-d-Propriétés biologiques des flavonoïdes

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle est parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques notamment les flavonoïdes sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique [44].

Les flavonoïdes absorbés avec nos aliments sont réputés protéger l'organisme contre les effets délétères des apports environnementaux oxydants. Des études épidémiologiques ont montré que la consommation de certains aliments ou boissons (certains jus de raisin, fruits rouges, thé, cacao) riches en flavonoïdes (particulièrement flavanols et anthocyanes) est inversement corrélée à la prévention de maladies neuro dégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson [45]. Les flavonones et les flavanols représentent environ 80% des flavonoïdes connus. La principale activité attribuée à ces composés est une propriété vitaminique P veino active .Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leurs résistances. Souvent anti-inflammatoires, ils peuvent être antiallergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, diurétiques, antibactériens et antiviraux [4].

Des recherches ont montré que de nombreux flavonoïdes possèdent des activités anti-oxydantes [46,47] et des activités anticancéreuses [46]. Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, nous citons la quercétine et la catéchine [48]. Ils jouent aussi un rôle dans la prévention des maladies coronariennes cardiaques [46].

Les flavonoïdes présentent aussi d'autres activités thérapeutiques telles que : l'activité antiallergique [49], antimicrobienne, antibactérienne [50,48], antifongique [48], le pouvoir d'inhibition d'enzyme et de complexation des métaux [51]. De même ils ont déjà été utilisés pour le traitement du diabète du fait qu'ils inhibent l'aldose réductase [48].

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries [51].

Une autre propriété majeure des flavonoïdes est celle de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes [51].

III- 2-2-Les tanins

III- 2-2-a-Définition

Le mot tanin fait référence à un large groupe de composés (poly) phénoliques naturellement produits par les plantes. Ces composés, solubles dans l'eau, se caractérisent par leur faculté à se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que les glucides, les acides nucléiques, les stéroïdes et les alcaloïdes pour former avec eux des complexes stables [52, 53, 54,55].

III- 2-2-b-Structure chimique et biosynthèse des tanins

- **Structure**

- **structure des tanins condensés**

La structure complexe des tanins condensés est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation. Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C2 et C3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B (Figure6). On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) des gallocatéchines (trihydroxylées) (Figure7) [30].

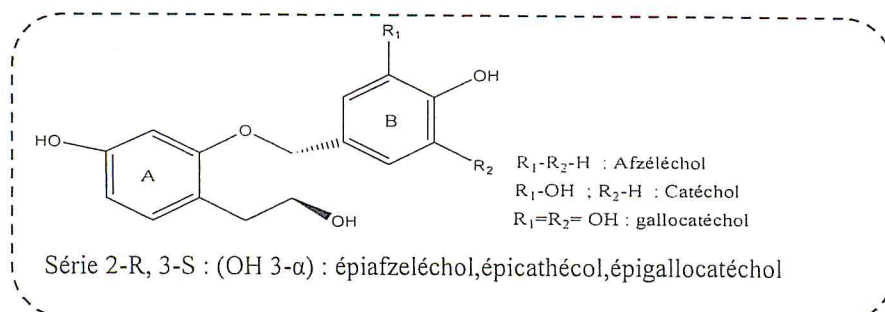


Figure 6:exemple de structure des tannins condensés

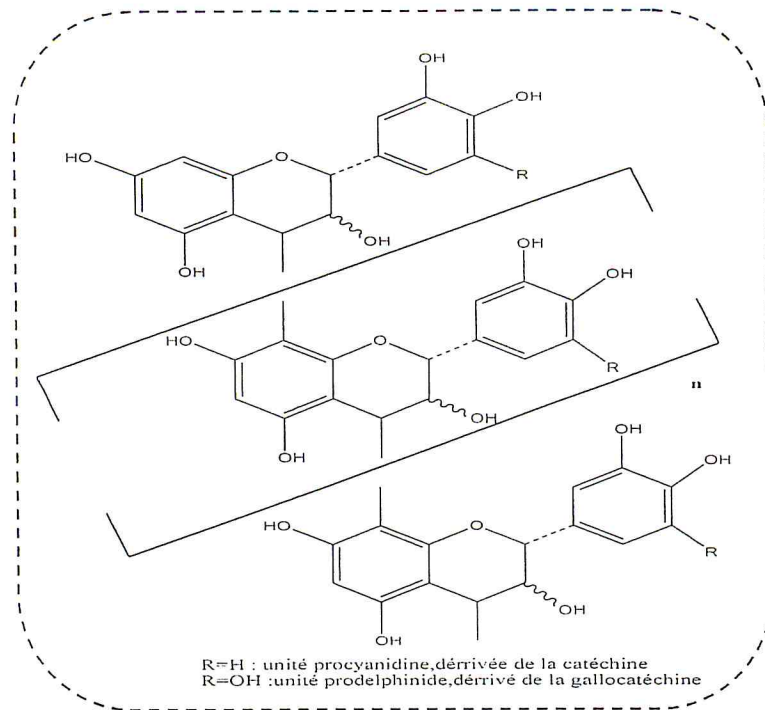


Figure 7:exemple de structure d'un tannin condensé

- **Structure des Tanins hydrolysables**

Les tanins hydrolysables sont constitués d'un noyau central -le glucose- et de chaînes latérales (En position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide phénolique. Des liaisons carbonées à carbone entre noyaux (liaisons biphenyle réalisées par couplage oxydatif), conduisent à des molécules plus rigides de solubilité diminuée dites les tanins éllagiques (figure8) [30].

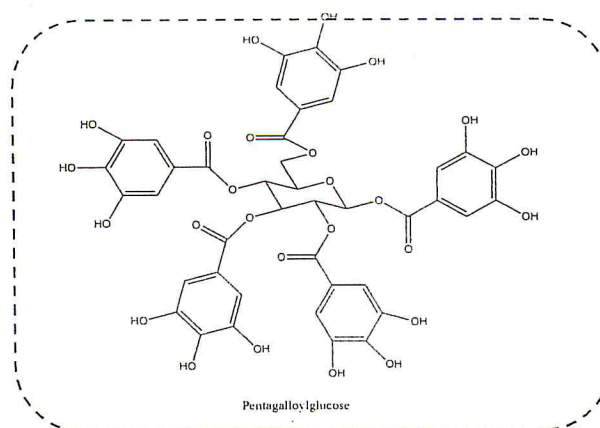


Figure 8:exemple de tannin hydrolysable [4]

- **Biosynthèse des tanins condensés**

L'élément structural de base des tanins condensés est le flavane-3-ol : catéchol et épicatechol (constitutif des procyanidols), gallocatéchol et épigallocatéchol (constitutifs des

prodelphinidols), plus rarement afzéléchol et épiafzéléchol (constitutifs des propélargonidols) dont biogénétiquement ces flavan-3-ols sont issus du métabolisme des flavonoïdes (figure 5).

• **Biosynthèse des tanins hydrolysables**

L'élément structural de base des tanins hydrolysables est l'acide gallique, biogénétiquement l'acide gallique (acide 3, 4,5-trihydroxybenzoïque) est issu du métabolisme de l'acide Shikimique. Il est très vraisemblablement formé par déshydrogénation directe de l'acide 3-déhydrochikimique. La glycosylation fait intervenir l'uridinediphosphoglucose (UDP-glucose) et l'on admet habituellement que le monogalloyglucose formé peut ensuite, par transacylation, conduire à un diester et ainsi de suite jusqu'au pentagalloyglucose. Ce penta-ester (le 1, 2, 3, 4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose) est le tanin le plus commun, il occupe une position centrale dans le métabolisme des tanins. En effet, la plupart des végétaux sont susceptible de poursuivre le métabolisme de cette molécule et de ces homologues et ce dans deux directions : la première c'est évoluer vers des tanins gallique et la deuxième c'est évoluer vers des tanins ellagiques, La voie biosynthétique de ce type de tanin est présentée dans la (figure 9).

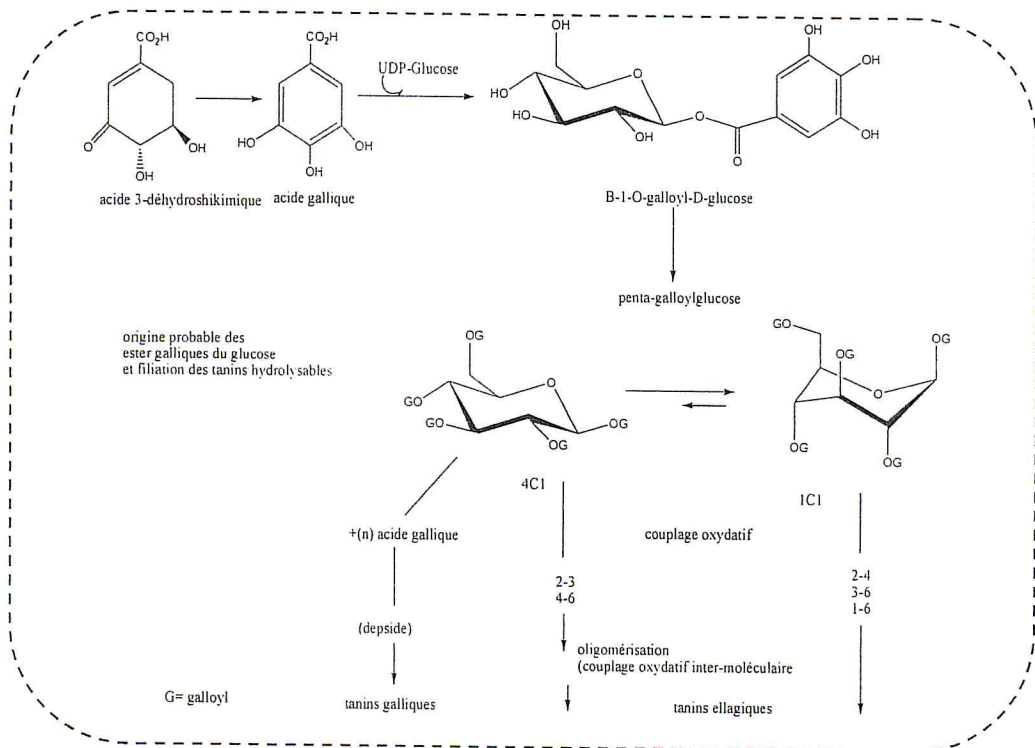


Figure 9 : Biosynthèse des tanins hydrolysable.

III- 2-2-c-Classification des tanins

Du point de vue structural, les tanins constituent un groupe chimique hétérogène, avec des structures moléculaires variées. En général, ils sont subdivisés en deux groupes distincts en fonction du type de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule [52]. Les deux grands groupes des tanins sont : les tanins condensés et les tanins hydrolysables [56].

▪ Les tanins condensés (flavan-3-ols)

Les tanins condensés sont des polymères de flavan-3-ols (éventuellement de flavan-3,4-diols) dérivés de la catéchine ou de ces nombreux isomères. Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules les attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide à chaud, il se transforme en pigment rouges et, pour cette raison, les formes dimères sont dénommées : « proanthocyanidines ». L'enchaînement des différentes unités constitutives se fait soit de manière linéaire grâce à des liaisons O-C-O (figure7) conduisent à des structures de plus en plus complexes qui restent cependant solubles dans l'eau [56].

▪ Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acides phénoliques ou de dérivés d'acides Phénoliques, ils sont d'abord caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénolique souvent du glucose et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique (cas des gallo tannins, quelque fois appelé « acide tannique » soit un dimère de ce même acide, l'acide ellagique (cas des tannins ellagiques ou ellagitannins). Une forme simple de tannins hydrolysables est le penta-galloyglucose (figure8), molécule très réactive qui est à l'origine de la plus part des formes complexes par exemple la castalagine (figure8)[56] .

III- 2-2-d-Propriétés biologiques des tannins

▪ Inhibition des enzymes

La capacité des tanins à complexer les protéines inclut l'inactivation possible d'enzymes soit directement, par fixation aux sites actifs, soit indirectement par l'encombrement stérique créé

par la fixation des molécules de tanins sur l'enzyme ou par interférence avec le substrat potentiel de nature protéique [57].

- **Activité anti-oxydante**

Grâce à leurs fonctions phénoliques qui ont un fort caractère nucléophile, les tanins sont d'excellents piègeurs de radicaux libres et de nombreux tannins présentent ainsi des propriétés anti-oxydantes [4, 58, 59,60]. Les radicaux libres tels que les ions ferreux sont des espèces chimiques instables et très réactives. Ils perturbent le processus de réplication de l'ADN, induisant des mutations cancérigènes. Ainsi, les activités antimutagènes et anticancéreuses attribuées à certains tanins ont été associées à leurs propriétés anti-oxydantes [61,62].

- **Effet antiseptique**

Certains remèdes phytothérapeutiques riches en tanins présentent des effets antimicrobiens [61, 63,64], antifongiques [4] ou antiviraux [62, 65,66]. Cette activité thérapeutique reconnue explique l'inscription des tanins comme antiseptique dans la pharmacopée médicale [4].

Chapitre III
Rappel sur les
activités biologiques

I- L'activité antioxydante

I-1- Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des radicaux libres et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [67]. Ce déséquilibre est à l'origine de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons, l'eau et les aliments que nous consommons [68].

I-2- Les antioxydants

Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité pour lutter contre les maladies modernes [69], ils constituent une piste particulièrement intéressante pour limiter les dégâts oxydatifs [70]. Les substances anti-oxydantes sont nécessaires pour la protection contre les agents oxydants, dont ils sont capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme [71].

I-3- Types d'agents antioxydants

Il existe deux types d'agents antioxydants : les antioxydants endogènes : sont des enzymes ou des protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase (SOD), Catalase (CAT) et Glutathion peroxydase (GPX) élaborés par notre organisme [72] et les antioxydants exogènes qui incluent la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les composés phénoliques tels que : les flavonoïdes, les tanins etc [73].

II- Activité antimicrobienne

II-1- Les infections bactériennes

L'infection est un ensemble de troubles qui résultent de la pénétration dans un organisme d'un agent pathogène comme les bactéries, les virus et les champignons. Elle peut être locale, générale ou focale [74].

II-2- Les agents antimicrobiens

On désigne par un agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes. Ils agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et selon leur spécificité d'action qui peut-être germicide ou germistatique [75].

II-3- Types d'agents antimicrobiens

Il existe trois types d'agents antimicrobiens : physiques (la chaleur et les radiations), chimiques (les alcools et les composés phénoliques) chimio thérapeutiques (les sulfamides et les antibiotiques) [75].

III- L'activité anti-inflammatoire [76]

III-1-Définition de l'inflammation

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique ou infectieuse. Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdien et non stéroïdien. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long cours.

III-2-Types d'agents anti-inflammatoires

Il existe deux types d'anti-inflammatoires : les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme l'aspirine et les anti-inflammatoires stéroïdiens corticoïdes.

VI- L'activité antalgique

VI-1-Définition de la douleur

Le traitement de la douleur est un problème de santé publique majeur où nous pouvons définir la douleur, comme la sensation ressentie par un organisme dont le système nerveux détecte un stimulus nociceptif [77]. Selon les rapports de l'IASP (International Association for the Study of Pain). La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à des lésions tissulaires réelle, potentielles ou décrites en termes de telles lésions [78].

VI-2-Types d'agents antalgiques

Il existe trois types d'antalgiques : les antalgiques non morphiniques (Paracétamol, aspirine, Kétoprofène) pour le traitement des douleurs faibles, les antalgiques dérivés de la morphines (associée a du paracétamol, tramadol) pour le traitement des douleurs modérées et les antalgiques morphiniques (morphine, l'oxycodone) pour le traitement des douleurs intenses [78].

Chapitre IV

Matériels et méthodes

Ce chapitre consiste à réaliser dans un premier temps :

- L'extraction de l'huile essentielle de *globularia alypum*.
- Caractérisation physico-chimique et détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- Un test phytochimique afin de mettre en évidence de façon qualitative la présence des flavonoïdes et des tanins dans la plante *globularia alypum* au moyen des tests de caractérisations basés sur des réactions de coloration.
- Extraction et dosage des flavonoïdes et des tanins de la *globularia alypum*.
- Analyses qualitatives par CCM et par HPLC des extraits flavoniques et tanniques.
- Dosage des éléments minéraux majeurs de *globularia alypum* par activation neutronique.

Dans un second temps, nous procéderons d'une part à l'évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et du contenu flavonique et tannique en utilisant la méthode de DPPH et d'autre part tester l'activité antiinflammatoire et l'activité antalgique de l'extrait flavonique (fraction butanolique) de la plante.

Notre stage pratique s'est étalé sur une période de quatre mois allant du mois de mars au mois de juin 2013 où :

- La partie extraction et le test de l'activité antioxydante sont effectuées au niveau de laboratoire de chimie de l'université Saad Dahlab –Blida.
- Les tests d'activité biologique : antimicrobienne, antiinflammatoire et antalgique ont été réalisés au sein du laboratoire du centre de recherche et de développement (CRD) Saïdal d'El-Harrach.

I- Matériel

I-1-Présentation et situation de la zone d'étude

La zone où nous avons effectué notre échantillonnage est située en pleine montagne (makta3 Lazrak) dans la commune de Hammam Melouane, située au sud de la wilaya de Blida, à environ 30 km à l'est de Blida et à environ 40 km au sud d'Alger.

I-2-Matériel biologique

I-2-1- Matériel végétal

Nous avons utilisé la partie aérienne de la *globularia alypum L.* (tiges et feuilles) pour l'extraction de l'huile essentielle de cette espèce et la partie aérienne en poudre pour l'extraction des flavonoïdes et des tanins.

La partie aérienne de la globulaire (*globularia alypum*) a été récoltée au mois de Mars 2013, qui correspond à la période de floraison.

L'identification botanique et la systématique de la plante ont été confirmées au niveau du laboratoire de recherche du Jardin d'Essais d'El Hama.



Figure 10 : *globularia alypum L.*



Figure 11 : Fleur de *globularia alypum L.*

I-2-2-Matériel animal

L'étude a porté sur les souris Albinos pour les tests d'activité anti inflammatoire et l'activité antalgique ayant les propriétés ci-dessous :

- Sexe : male, femelle.
- Poids : 19 à 21g.
- Nombre : 54.
- Alimentation : Granulés O.N.A.B.
- Boisson : Eau de robinet ab libitum.

- Condition d'hébergement :
 - T : 20 à 24°C.
 - Humidité : 50%.
 - Eclairage : 10h.

I-2-3-Souches microbiennes

Le support microbien disponible au niveau du laboratoire de microbiologie du CRD-Saidal est composé de quatre souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *bacillus subtilus* et une levure : *Candida albicans*.

Tableau 5 : Caractéristiques de souches microbiennes utilisées.

Souches bactériennes	Type des bactéries	références
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	ATCC 6569
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	ATCC 9027
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	ATCC 4157
<i>bacillus subtilus</i>	Gram +	ATCC 6633
Levure		
<i>Candida albicans</i>		ATCC 24433

ATTC : American type culture collection.

I-3-Matériel non biologique :

Pour les équipements, verreries, consommables et milieu de culture utilisés, voir Annexe 1

II- Méthodes

II-1-Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité a été déterminé selon la pharmacopée européenne à partir d'une masse de matière végétale introduite dans une étuve à 105 °C jusqu'au poids constant dont la teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subie durant le séchage.

Le taux d'humidité est calculé par la formule suivante :

$$H\% = [(poids\ x - poids\ y) / (poids\ x)] \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

x → Poids de l'échantillon avant l'étuvage.

y → poids de l'échantillon après l'étuvage.

H% → taux d'humidité exprimé en pourcentage.

II-2-Extraction des huiles essentielles au laboratoire

Nous avons réalisé l'extraction de l'huile essentielle de *globularia alypum L.* à l'échelle laboratoire en utilisant le procédé entraînement à la vapeur d'eau.

II-2-1- Appareillage

L'extraction de l'huile essentielle de *globularia alypum* par entraînement à la vapeur d'eau (figure12).



Figure 12: Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.

II-2-2- Protocol expérimental [79]

- Mettre la matière végétale (la partie aérienne de la globulaire) dans une ampoule à décanter d'une capacité de 2 L.
- porter à ébullition l'eau.
- Récupérer le distillat dans un récipient (bécher).
- Placer l'eau contenant l'huile essentielle dans une ampoule à décanter avec l'éther diéthylique. Extraire en agitant (et en dégazant), puis laisser décanter.
- Récupérer la phase étherée dans un bécher.
- Sécher la phase étherée avec du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), puis récupérer le filtrat dans un ballon rodé.
- Evaporer l'éther diéthylique à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis récupérer et conserver l'HE au réfrigérateur à l'abri de la lumière.

II-2-3- Calcul du rendement en huile essentielle

Le calcul du rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée (M_{HE}) en (g) et la masse de la matière végétale (M_{MV}) utilisée en (g) multiplié par 100.

$$\text{R}\% = (M_{\text{HE}}/M_{\text{MV}}) \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

II-2-4- Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)

L'huile essentielle de *globularia alypum* a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, dans les conditions opératoires suivantes :

- Température de l'injecteur : 280°C.
- Température du four : 80°C pendant 3min, de 80°C jusqu'à 220°C à raison de 4°C/min.
- Volume injectée : 3µl. passeur d'échantillon automatique.
- Détecteur : MS.

- Temps de scan : 0.2 sec.
- Délai de solvant : 5.9 min.
- Mode : SCAN entre m/z [20-470].
- Temps d'analyse : 41 min.
- Type d'ionisation : électronique.

L'identification des composés est confirmée par comparaison de leurs spectre de masse ion fragment caractéristiques obtenus expérimentalement à ceux inventoriées dans la banque de bibliothèques spectrales ((Wiley), (NIST)).

II-3-Tests phytochimiques

Ce test a été réalisé sur l'extrait aqueux par un épuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude et sur l'extrait éthanolique par un épuisement du matériel végétal avec l'éthanol.

- **Epuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude**

Dans un ballon mono col surmonté d'un réfrigérant, 10 g de matériel végétal est mis en présence de 60 ml d'eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait aqueux est récupéré.

- **Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol**

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 10 g de matériel végétal est mis en présence de 60 ml d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est récupéré.

II-3-1-Mise en évidence des flavonoïdes

- Le test a été réalisé sur l'extrait éthanolique.

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait avec 1 ml d'HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est révélée par l'apparition d'une couleur rose ou rouge qui se développe après 3 minutes [30].

II-3-2-Mise en évidence des tanins

Les tests ont été réalisés sur l'extrait aqueux et sur l'extrait éthanolique :

- Sur l'extrait aqueux : 1 ml de ce dernier est traité avec 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl₃ diluée. la présence des tanins est révélée par l'apparition d'une coloration vert foncée ou bleu vert [80].
- <Sur l'extrait éthanolique : 1 ml de ce dernier est traité avec 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ diluée. La présence des tanins est révélé par l'apparition d'une coloration bleu- noire (tanins galliques), bleu-verte (tanins cathéchiques) [80].

II-4-Extraction des flavonoïdes

Nous avons réalisé l'extraction des flavonoïdes de *globularia alypum* à l'échelle laboratoire par macération dans un mélange de solvant organique /aqueux.

II-4-1-Protocole expérimental

II-4-1-a-Préparation de l'extrait brut [81]:

Les flavonoïdes sont extraits du matériel végétal par macération dans un mélange hydroalcoolique : éthanol/eau (50/50 : V/V) à température ambiante et à l'obscurité, cette opération est renouvelée trois fois toute les 24h. L'extrait hydro alcoolique est récupéré après filtration. Ensuite le mélange éthanol/eau est éliminé du filtrat par évaporation permettant d'obtenir l'extrait brut de *globularia alypum*.

L'extrait brut est repris dans de l'eau distillée bouillante solubilisant quantitativement les flavonoïdes, ensuite il est laissé décanter à température ambiante pendant 12 heures. Le contenu flavonique global a été fractionné ultérieurement.

II-4-1-b-Fractionnement de l'extrait brut :

Dans des ampoules à décanter, le contenu flavonique global est partitionné en phases par divers solvants organiques spécifiques : Phase éther diéthylique, phase acétate d'éthyle, phase n- butanol. La phase aqueuse est mélangée avec chaque solvant, le mélange est laissé décanter et la phase organique supérieure est récupérée. Les solvants sont par la suite évaporés et les extraits obtenus sont considérées comme étant les fractions de l'éther diéthylique , d'acétate d'éthyle et du n- butanol . Le schéma suivant (figure13) présente les différentes étapes de l'extraction des flavonoïdes.

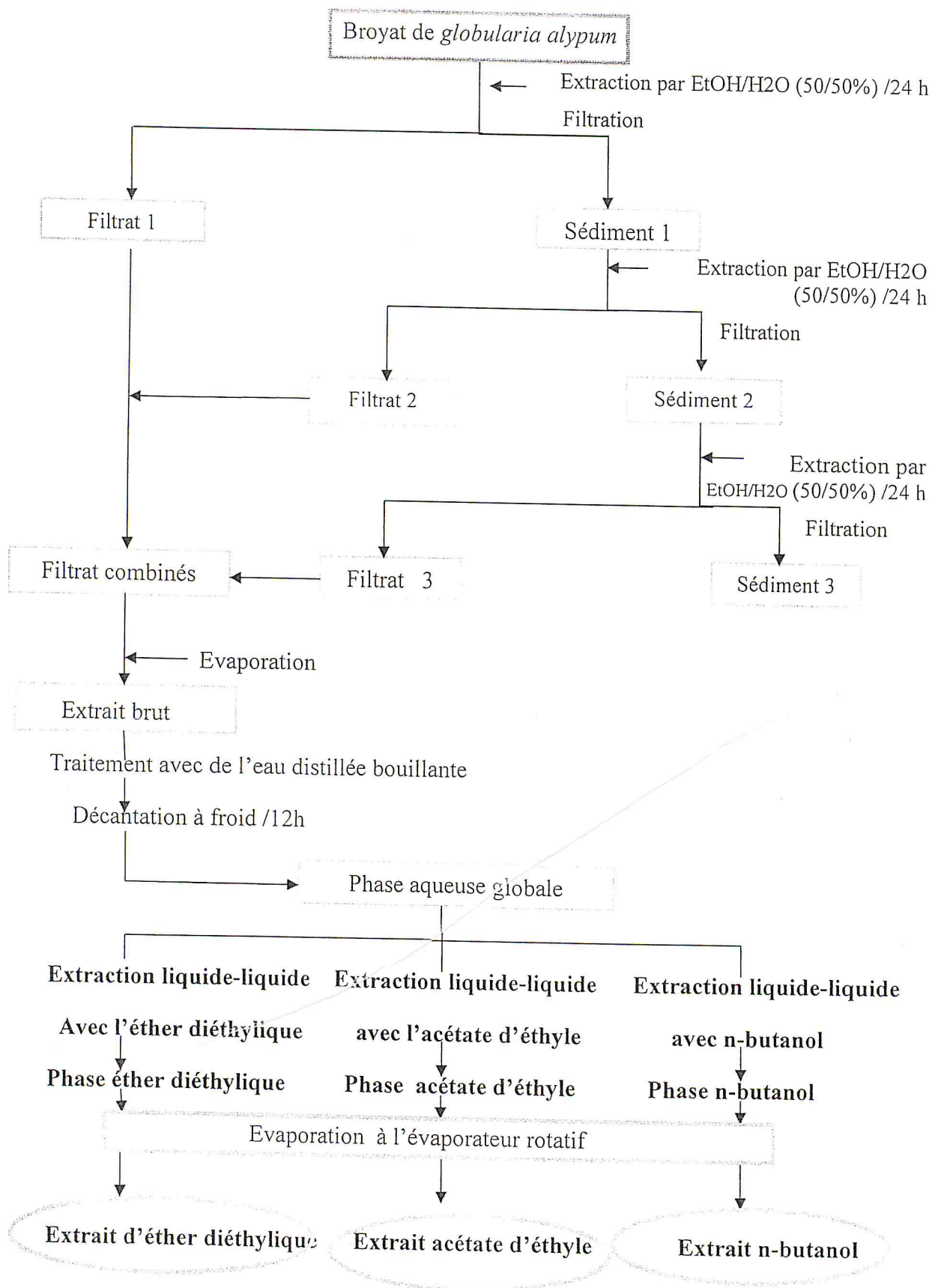


Figure 13: Protocole d'extraction des flavonoïdes de *globularia alypum* L.

II-4-2-Les rendements en extraits secs flavonique obtenus à partir de l'espèce étudiée

Le calcul du rendement de l'extrait brut et le rendement de chaque extrait flavonique (fraction éther d'éthylque, acétate d'éthyle et 1-butanol) a été déterminé par rapport à 100 g de matériel végétal sec selon la relation suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = [(P1 - P2) / P3] \times 100 \quad (\text{Eq.3})$$

P1 : poids du flacon après évaporation.

P2 : poids du flacon avant évaporation.

P3 : poids de la matière végétale de départ.

II-5-Extraction des tanins

Nous avons réalisé l'extraction des Tanins de *globularia alypum* à l'échelle laboratoire par macération dans un mélange de solvant organique /aqueux.

II-5-1-Protocole expérimental

II-5-1-a-Préparation de l'extrait brut [82] :

L'extraction des tanins a été effectuée sur la poudre dont 2,5g de poudre de matériel végétal a été extraite par 50 ml du mélange acétone/eau distillée (35/15, V/V) durant trois jours à une température ambiante. La solution est filtrée ensuite elle est évaporée à 40°C par un évaporateur rotatif pour éliminer l'acétone.

II-5-1-b-Traitement de l'extrait brut :

A la phase aqueuse on ajoute 16 ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Après la séparation de la phase organique, la phase aqueuse a été extraite deux fois avec 15 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange des deux phases est évaporé à sec à 40°C puis pesé et repris par 3 ml de méthanol. Le schéma suivant (figure14) présente les différentes étapes de l'extraction des tanins.

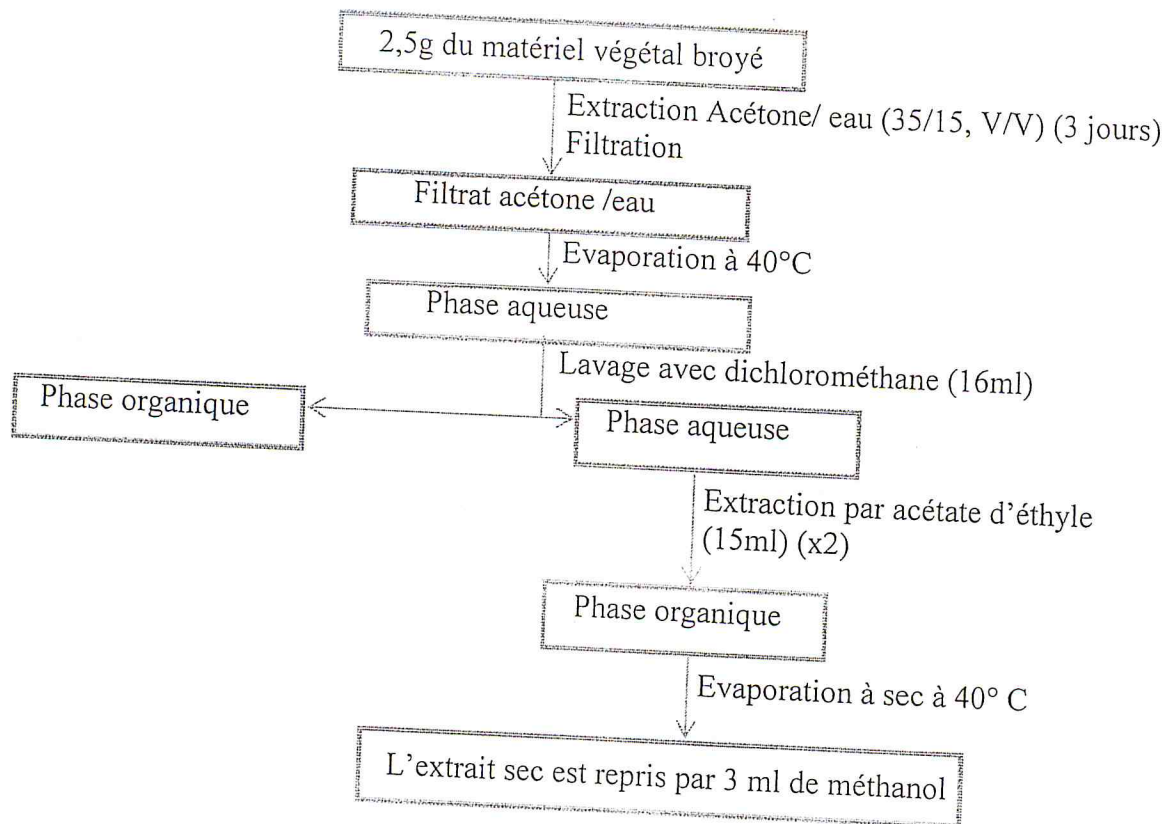


Figure 14 : Protocole d'extraction des tanins de *globularia alypum*.

II-5-2-Calcul du rendement en extrait tannique

Le rendement en extrait tannique a été déterminé par rapport à 2,5 g de matériel végétal sec et broyé selon l'équation 3.

II-6-Analyse qualitative par chromatographique sur couche mince CCM

II-6-1-Principe de la technique et appareillage

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La phase mobile est un seul solvant ou un mélange de solvants qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- La cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre de forme variable, fermé par un couvercle.

- La phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant fixé sur la plaque à l'aide d'un liant.
- L'échantillon : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- L'éluant : un solvant pur ou un mélange qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon [83].

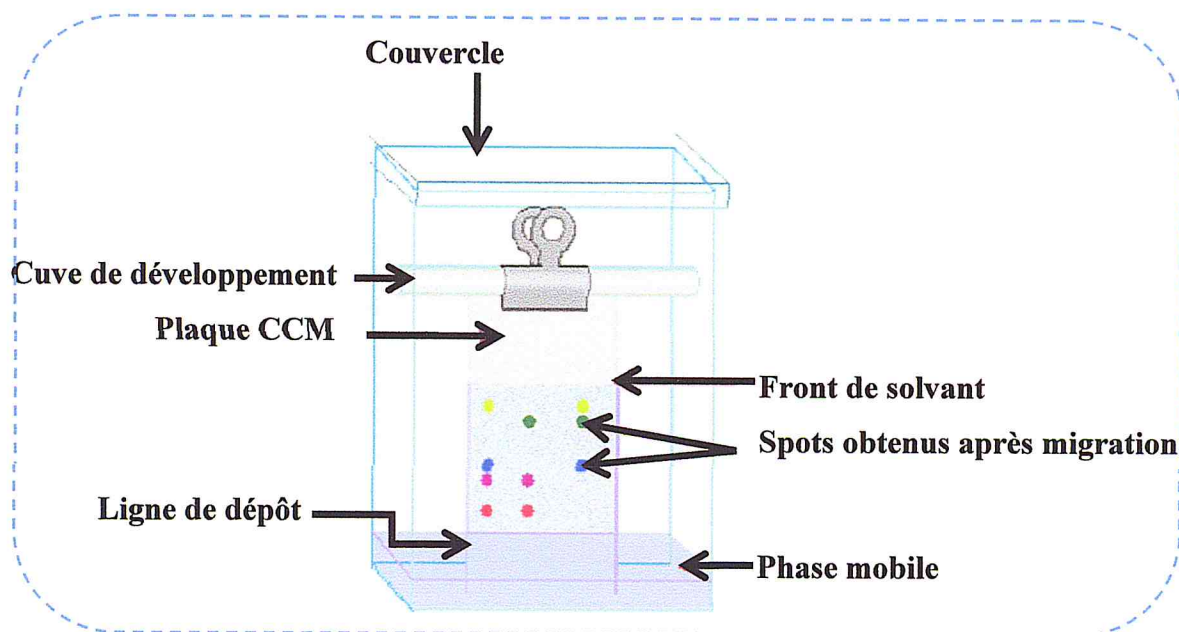


Figure 15: Schéma représentant l'appareillage et le développement chromatographique d'une plaque.

II-6-2-Mode opératoire

Dans notre travail, nous avons utilisé des plaques de chromatographie sur couche mince de gel de silice sur un support en verre de taille 20x20 cm pour la séparation des fractions éther d'éthylique, acétate d'éthyle, 1-butanol et l'extrait tannique.

II-6-2-a-Préparation de la phase mobile

La phase mobile est préparée en utilisant un système de solvant [84].

Système utilisé: Chloroforme/ méthanol/acide acétique/eau ; (40:6:0,1:0,2) (v: v: v: v).

II-6-2-b-Préparation de la cuve chromatographique

La phase mobile ainsi préparée a été introduite au fond d'une cuve en verre bien nettoyée et munie d'un couvercle avec une hauteur de 2 cm, la cuve ensuite est laissée se saturer.

II-6-2-c-Dépôt des échantillons

Les échantillons sont solubilisés dans le méthanol, ils sont appliqués en petits spots sous forme de points dont ils ont été déposés à l'aide d'une micropipette à 1 cm du bord inférieur de la plaque. La plaque est déposée verticalement dans la phase mobile. Pour une bonne élution, la cuve contenant le solvant d'élution doit être saturée.

II-6-2-d-Développement des plaques

La phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque doit être séchée à température ambiante. Si les spots ne sont pas colorés, elles doivent être révélées.

II-6-2-e-Révélation

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque. Dans le cas contraire, on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation qui peut se faire soit aux UV ou bien par des méthodes chimiques.

- **Révélation aux UV** : Elle permet de mettre en évidence sous forme des taches des substances qui absorbent les UV entre 254nm et 365nm.
- **Révélation par des méthodes chimiques** : Elle consiste à pulvériser la plaque CCM par un réactif plus ou moins spécifique (H_2SO_4) qui donne après réaction chimique avec les substances un produit coloré.

II-6-2-f-Identification des flavonoïdes

Les spots flavoniques représentant les constituants du dépôt ont été caractérisés par leur fluorescence sous lampe UV et par leur rapport frontal R_f (le rapport de la distance parcourue par la tache sur celle parcourue par la phase mobile (front du solvant)).

- **rapport frontal (R_f)**

Le rapport frontal (R_f) est déterminé pour chaque constituant comme suit :

$$R_f = d/D \quad (\text{Eq.4})$$

d: Distance parcourue par le constituant.

D : Distance parcourue par le front de l'éluant.

II-7-Analyse qualitative par Chromatographie liquide à haute performance HPLC

La chromatographie liquide haute performance, CLHP – HPLC en anglais –, est une technique de séparation analytique.

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelée phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie, le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui permet de diminuer le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

II-7-1-Conditions opératoires :

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe HPLC-RP-C18 dans les conditions suivantes :

- Débit: 0,5 ml/min.
- Pression de travail : 100-150 bars.
- Volume d'injection:10 µl.
- Longueur d'onde: 254 nm.
- Concentration de l'échantillon: 1–5 mg/ml.
- Temps d'analyse : 15 min.
- Température : 25°.

La phase mobile est de composition constante (mode isocratique), elle est composée d'un mélange méthanol - eau (60 : 40 V/V) [73].

II-8-Dosage des polyphénols totaux

La quantité de phénols contenue dans les différents extraits de la plante est mesurée par la méthode de Folin-ciocalteu. Elle mesure le potentiel d'oxydoréduction des phénols.

Cette méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour le dosage les polyphénols, pour les raisons suivantes :

- (i) c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité.
- (ii) c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde [85].

II-8-1-Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune, constitué de polyhétérocycles acides contenant l'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ et l'acide phosphomolybdique $H_3PM_{12}O_{40}$ dont la réaction est : Oxydation des phénolates, réduction des polyhétérocycles et formation d'un complexe molybdène (Mo_8O_{23})- tungstène (W_8O_{23}) stable de couleur bleu qui absorbe fortement à une longueur d'onde de l'ordre de 760 nm. Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique.

II-8-2-Mode opératoire [86]

1 ml de l'extrait brut méthanolique est introduit dans des tubes à essai à différentes concentrations allant de 0.05 à 0.25 mg /ml. 9 ml d'eau distillée et 1 ml du réactif Folin-ciocalteu sont mélangés. Après 5 min, 10 ml de la solution de 7 % Na_2CO_3 sont ajoutés. La solution est ensuite ajustée à 25ml avec l'eau distillée et agitée. Après incubation à 23°C pendant 90 min, l'absorbance est lue contre le blanc à 750 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS. La même procédure est appliquée pour chaque extrait de plante.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme Témoin.

II-8-3-Expression des résultats

Pour chaque extrait des plantes étudié, la densité optique a été mesurée puis utilisée dans l'équation de la courbe d'étalonnage afin de déterminer la concentration de chaque extrait. La masse de chaque extrait correspondante aux concentrations peut être déterminée et exprimée en mg d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG / g E).

II-9-Dosage des flavonoïdes

La détermination de la teneur en flavonoïdes totaux dans les différents extraits de la plante est mesurée par la méthode de trichlorure d'aluminium.

II-9-1-Principe

La quantification des flavonoïdes se fait par le trichlorure d'aluminium. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui absorbe dans le visible à 430 nm. Le flavonoïde standard utilisé dans cette méthode est la quercétine.

II-9-2-Mode opératoire [87]

Une gamme de 5 concentrations de quercétine allant de 2.5 à 25 µg /ml a été préparée à partir d'une solution mère de 40 µg /ml de concentration. 1 ml de chaque extrait et du standard a été ajouté à un volume égal d'une solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS.

II-9-3-Expression des résultats

Pour chaque extrait des plantes étudié, la densité optique a été mesurée puis utilisée dans l'équation de la courbe d'étalonnage, afin de déterminer la concentration de chaque extrait. La masse de chaque extrait correspondante aux concentrations peut être déterminée et exprimée en microgrammes d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (µg EQ/g d'extrait).

II-10-Dosage des tanins

La détermination de la quantité des tanins dans l'extrait tannique est estimée en utilisant la méthode de la vanilline en milieu acide.

II-10-1-Principe

La méthode à la vanilline en milieu acide est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère.

II-10-2-Mode opératoire [88]

Un volume de 50 µl de l'extrait brut est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) puis mélangé. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS.

II-10-3-Expression des résultats

Pour chaque extrait des plantes étudié, la densité optique a été mesurée puis utilisée dans l'équation de la courbe d'étalonnage, afin de déterminer la concentration de chaque extrait. La masse de chaque extrait correspondante aux concentrations peut être déterminée et exprimée en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g d'extrait).

II-11-Etude des activités biologiques

II-11-1-Activité antioxydante

Cette activité a pour but d'étudier le pouvoir antioxydant des extraits flavoniques, tanniques et de l'huile essentielle de *globularia alypum* par la méthode au DPPH (Test de piégeage du radical libre DPPH).

II-11-1-a-Principe :

Le DPPH est un radical stable ; cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2-diphényl -1-picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en (2,2 Diphényl-1-picryl hydrazine) de couleur jaune [11].

II-11-1-b-Mode opératoire [89]

25µl de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 975µl de la solution méthanolique du DPPH (0,024g/l), le mélange est laissé à l'obscurité. Après 30 min, la décoloration des mélanges par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm, nous procédons de la même manière pour l'antioxydant de référence : l'acide ascorbique.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) :

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})}{\text{Abs contrôle}} \times 100 \quad (\text{Eq.5})$$

II-11-1-c-Calcul des IC50

L'EC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (est la concentration de l'échantillon testée qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH). Ces EC50 sont déterminées graphiquement à partir des graphes tracés dont l'abscisse représente la concentration des fractions testées et l'ordonnée représente l'activité antioxydante en pourcentage.

II-11-2-Etude de l'activité antimicrobienne

Cette activité a pour but d'étudier qualitativement l'effet antimicrobien des extraits : flavonique, tannique et de l'huile essentielle de *globularia alypum* par la méthode de diffusion sur un milieu solide.

II-11-2-a-Principe

Cette méthode consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne des extraits : flavonique, tannique et de l'huile essentielle de *globularia alypum* en les mettant en présence des germes testés, dont la concentration est ajustée à 10^7 - 10^8 germes /ml avec un spectrophotomètre.

Des disques absorbants stériles sont imprégnés d'une quantité d'échantillon à tester et déposés sur une gélose inoculée avec les souches testées. La diffusion des échantillons à tester dans la gélose permet d'avoir comme résultat positif après incubation une zone d'inhibition.

La lecture des résultats après incubation est faite par mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenus pour chacune des souches.

II-11-2-b-Protocole expérimental [90]

▪ Préparation de la première couche de milieu

-Faire fondre les milieux Mueller-Hinton (MH) et Sabouraud (SAB) dans un bain marie à 95°C.

-Verser aseptiquement une première couche des deux milieux dans des boîtes de pétrie à raison de 20 ml par boîte.

-Laisser refroidir et solidifier sur la paillasse.

▪ Préparation de l'inoculum

-à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h pour les bactéries et 48h pour les levures, réaliser des suspensions microbiennes troubles en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées, qu'on dépose dans 5 à 10 ml d'eau physiologique .

-agiter au vortex.

-réaliser une première lecture de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre. L'absorbance doit être comprise entre 0,22 et 0,32 pour les bactéries et entre 2 et 3 pour les levures et cela a une longueur d'onde de 620nm. Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus correspondant à une concentration optimales de 10^7 - 10^8 germes /ml. Si une valeur trouvée à la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle, on ajuste soit en ajoutant de l'eau physiologique, si la valeur est supérieure à la valeur maximale ou en ajoutant des colonies, si elle est inférieure à la valeur minimale. A chaque fois une nouvelle lecture de l'absorbance est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées.

NB : l'inoculum doit être utilisé dans les 15 min suivant sa préparation.

▪ Préparation de la deuxième couche du milieu

-Faire fondre les milieux MH et SAB.

-Laisser refroidir jusqu'à une température de 45°.

-Ensemencer 50 ml du milieu MH et SAB avec 200µl de chaque suspension.

-Agiter manuellement.

-Déposer rapidement 6ml de chaque milieu et ensemencer sur la surface de la première couche de gélose solidifiée.

-Etaler la couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme.

-Laisser solidifier sur paillasse.

▪ Dépôt de disques

-A l'aide d'une pince stérile, prélever à chaque fois un disque stérile. Ce disque est imbibé avec l'échantillon a testé en mettant seulement 25 µl qui vont être absorbé progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque.

-Déposer les sur la surface de la gélose.

-Laisser diffuser les boites sur paillasse pendant 30 min.

-Incuber à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25 °C pendant 48 h pour les levures.

II-11-2-d-Expression des résultats

L'activité antimicrobienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'un Pied à Coulisse le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques.

Présence de zone claire autour de disque : présence d'activité inhibitrice.

Absence de zone claire autour de disque : absence d'activité inhibitrice.

II-11-3-Etude de l'activité anti inflammatoire

L'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait flavonique (fraction butanolique) de *globularia alypum* selon la méthode de l'œdème de la patte de souris.

II-11-3-a-Principe

L'injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte de la souris provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un produit anti inflammatoire. Cette étude permet de comparer la réaction de l'œdème plantaire après administration du produit anti inflammatoire à tester et du produit de référence (l'acide acétylsalicylique).

II-11-3-b-Protocole expérimental [91]

Mettre les souris à jeun pendant 18 heures avec accès libre à l'eau. Au moment de l'expérimentation, peser les souris et les répartir en cinq lots homogènes de six souris par lot.

Au temps To : (gavage)

Administrer aux quatre lots par voie orale (Figure 16), les suspensions suivantes:(**Annexe 2**)

- Lot témoin : chaque souris reçoit 0,5ml d'eau distillée.
- Lot essai 1 : chaque souris reçoit 0,5ml de la fraction butanolique à la dose de 0.1g/ml.
- Lot essai 2 : chaque souris reçoit 0,5ml de la fraction butanolique à la dose de 0.2g/ml.
- Lot essai 3 : chaque souris reçoit 0,5ml de la fraction butanolique à la dose de 0.3g/ml.

- Lot essai 4 : chaque souris reçoit 0,5ml du produit de référence à la dose de 2 mg/ml.

NB : les résultats du lot témoin et de référence ont servi de juger l'effet de notre extrait pour les trois doses.



Figure 16 : Administration par voie orale de la fraction butanolique de *globularia alypum*L.

Au temps $T_0 + 30min$:

Injecter la solution de carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche sous un volume de 0,025ml (Figure8), à toutes les souris.



Figure 17 : Injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de la souri.

Au temps T_0+4h :

Sacrifier les souris par rupture de la nuque, et couper les pattes postérieures droites et gauches à hauteur de l'articulation et les peser sur une balance analytique.

II-11-3-c-Expression des résultats

- Calculer les moyennes arithmétiques des poids de la patte gauche et de la patte droite pour chaque lot.
- Calculer le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (% d'œdème) par la formule suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{\text{moyenne des poids de patte droite} - \text{moyenne des poids de la patte gauche}}{\text{moyenne des poids de patte droite}} \times 100 \quad (\text{Eq.6})$$

- Calculer le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport au témoin :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}} \times 100 \quad (\text{Eq.7})$$

II-11-4-Etude de l'activité antalgique [92]

L'activité antalgique de l'extrait flavonique (fraction butanolique) de *globularia alypum* a été recherchée chez les souris par la méthode de l'acide acétique.

II-11-4-a-Principe

L'injection de l'acide acétique par voie intrapéritonéale chez la souris provoque une réaction douloureuse. Cette douleur se manifeste par des mouvements de torsion de l'abdomen, avec étirement des pattes postérieures (crampes), qui peut être réduite par un produit antalgique. Cette étude permet de comparer la réduction du nombre de crampes après administration du produit antalgique (la fraction butanolique), et du produit de référence (Paracétamol).

II-11-4-b-Protocol expérimental :

Mettre les souris à jeun la veille du test (18h à jeun). Au moment de l'expérimentation, peser les souris et les répartir en quatre lots de six souris.

A temps T_0 : (gavage)

Administrer aux quatre lots par voie orale les suspensions suivantes:(Annexe 2)

- *Lot témoin:* 0,5 ml d'eau distillée pour chaque souris par voie orale.
- *Lot de référence:* 0.5ml de la solution de Paracétamol à la dose de 2 mg/ml.
- *Lot essai 1:*0.5ml fraction butanoliqueà la dose de 0.2g/ml.
- *Lot essai 2:* 0.5ml fraction butanoliqueà la dose de 0.3g/ml.

Au $T_0 + 30$ mm :

Injecter à tous les sourisla solution de l'acide acétique à 1% par voie intra péritonéale (Figure 9) sousun volume de 0, 2 ml par souris, ou Les souris sont séparés dans des cages individuelles



Figure 18 : Injection de l'acide acétique à 1% par voie intra péritonéale.

Au $T_0 +35$ min :

Compter le nombre de crampes pour chaque souris, par observation directe des souris séparées, La durée d'observation est de 10 minutes.

II-11-4-c-Expression des résultats

- Calculer les moyennes arithmétiques des crampes pour chaque lot.

- Calculer le pourcentage de réduction de crampes (pourcentage de protection) chez les souris traitées par rapport aux témoins.

$$\% \text{ de protection} = \frac{\text{moyennes des crampes du lot témoin} - \text{moyennes des crampes du lot essai}}{\text{moyenne des crampes du lot témoin}} \times 100 \text{ (Eq.8)}$$

II-12- Dosage des éléments minéraux par activation neutronique (NAA)

Le présent travail a pour but de doser les éléments minéraux majeurs de *globularia alypum* par activation neutronique.

II-12-1-Principe de la méthode

L'analyse par activation neutronique consiste à irradier l'échantillon par un flux de neutrons et analysés les spectres d'énergies des rayons γ émis qui sont les émetteurs caractéristiques des noyaux. La mesure des intensités des rayonnements γ permet de déterminer le nombre de noyaux [93].

II-12-2-Conditions opératoires

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- Irradiation :

Puissance d'irradiation : 1 Mwatt.

Durée d'irradiation : 5 heures.

Durée de refroidissement : 4 jours.

- Mesure spectrométrique :

Détecteur : germanium hyper pur modèle GR3019.

Résolution : 1,9Kev.

Logiciel de déconvolution du spectre γ : GAMMA VISION.

Chapitre V

Résultats et discussions

I- Le taux d'humidité

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment de 60 à 80 % d'eau. Nous avons déterminé la teneur en eau de la partie aérienne de *globularia alypum* selon la méthode pondérale. C'est la détermination de la perte de masse par séchage à l'étuve. La plante renferme un taux d'humidité de 35%. Cela signifie approximativement le quart, plus de la moitié du poids de la plante fraîche est constituée par la matière sèche.

On note que la teneur en eau est étroitement liée à l'humidité du milieu extérieur et la situation géographique. De ce fait, cette valeur varie d'une région à une autre et même d'un climat à un autre [94]. Notons aussi que l'eau est nécessaire pour la vie elle-même de chaque cellule de la plante. Toutes les réactions biochimiques du vivant se produisent en effet en milieu aquatique. Il ne peut y avoir de division cellulaire, donc de la croissance et du développement de nouveaux organes, sans eau.

II-Extraction de l'huile essentielle de *globularia alypum* L

II-1- Rendement en huile essentielle de *globularia alypum* L

Nous avons réalisé une série d'extraction de l'huile essentielle de *globularia alypum* par entraînement à la vapeur d'eau, le rendement en huile essentielle varie entre 0,0011% et 0,0025%. Le rendement moyen en huile essentielle obtenu est de l'ordre de 0,0018%. Cette valeur est très faible, peut-être l'HE se trouve sous forme de trace dans cette espèce, ce qui explique que le rendement était quasi-nul.

II-2- Variation du rendement en huile essentielle en fonction de la durée d'extraction

nous avons réalisé une étude cinétique sur l'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de *globularia alypum*.

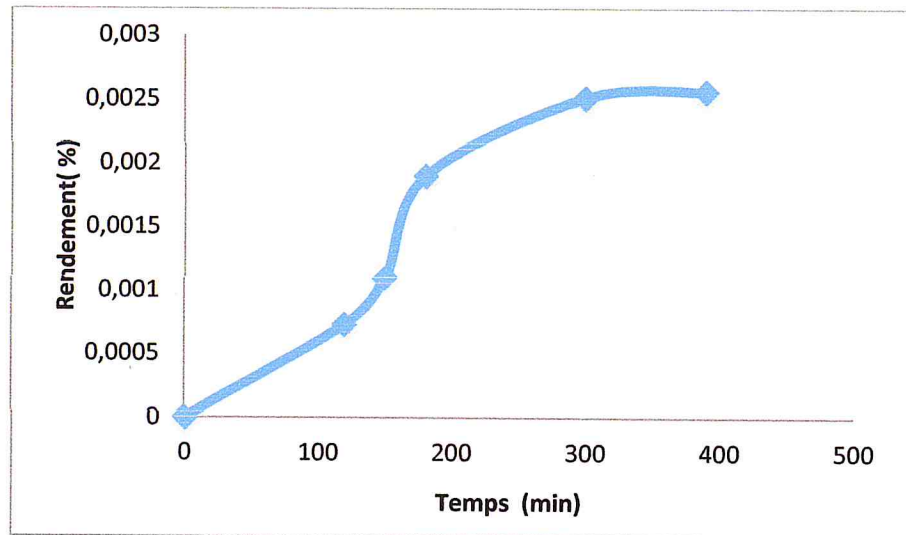


Figure 19 : Evolution du rendement de l'huile essentielle de *globularia alypum L*
En fonction de la durée d'extraction.

D'après les résultats obtenus, on remarque que l'allure générale de la courbe représentant le rendement en fonction du temps est croissante. Le rendement augmente progressivement jusqu'à atteindre un rendement égale à 0,0025% au bout de 300 min et la courbe tend vers un pseudo palier, qui correspond au rendement maximum possible.

II-3- Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *globularia alypum*

Nous avons déterminé les propriétés organoleptiques (aspect, couleur et odeur) de l'huile essentielle dans le but de caractériser l'huile essentielle de l'espèce étudiée.

Tableau 6: Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *globularia alypum L*.

Aspect	Couleur	Odeur
Visqueux	Jaune verdâtre	Forte odeur, Caractéristique



Figure 20: Huile essentielle de *globularia alypum L*.

II-4- Analyse de la composition chimique de l'HE de *globularia alypum L* par (CG/MS)

Les résultats de la composition chimique de l'HE du *globularia alypum L*, réalisée par CG-SM, sont rapportés dans le tableau2, Les différents composés ont été listés selon leur temps de rétention.

Tableau 7: Composition chimique de l'HE de *globularia alypum L*.

N°	Temps de rétention (min)	Teneur (%)	Nom des composés	Formule
1	14,90	1,80	2-Methoxy-4-vinylphenol	C ₉ H ₁₀ O ₂
2	16,99	7,05	Cinnamate de méthyle	C ₁₀ H ₁₀ O ₂
3	19,51	23,80	Cinnamate d'éthyle	C ₁₁ H ₁₂ O ₂
4	20,47	3,08	NI*	/
5	23,01	1,32	NI*	/
6	26,65	1,32	NI*	/
7	28,36	2,20	NI*	/
8	28,48	5,73	Décanoate d'éthyle	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
9	29,72	2,64	NI*	/
10	31,07	1,76	NI*	/
11	31,83	11,01	Acide pentadécanoïque,14methyl, méthyle ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
12	33,37	1,76	NI*	
13	33,50	35,24	héxadécanoate d'éthyle	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
14	33,64	1,32	NI*	/

NB : NI* non identifié

L'analyse par CG/MS a permis l'identification de la composition chimique de l'huile essentielle de *globularia alypum*. Six composés ont été identifiés :l'héxadécanoate d'éthyle (35,24%), suivi par le Cinnamate d'éthyle (23,80%),l'acide pentadécanoïque,14methyl, méthyle ester (11,01%),le Cinnamate de méthyle (7,05%) et le décanoate d'éthyle (5,73%) .Le composé 2-Methoxy-4-vinylphenol (1,80%) présentait la fraction minoritaire. Le

reste des composés n'ont pu être identifiés. Le chromatogramme est donné dans la figure suivante.

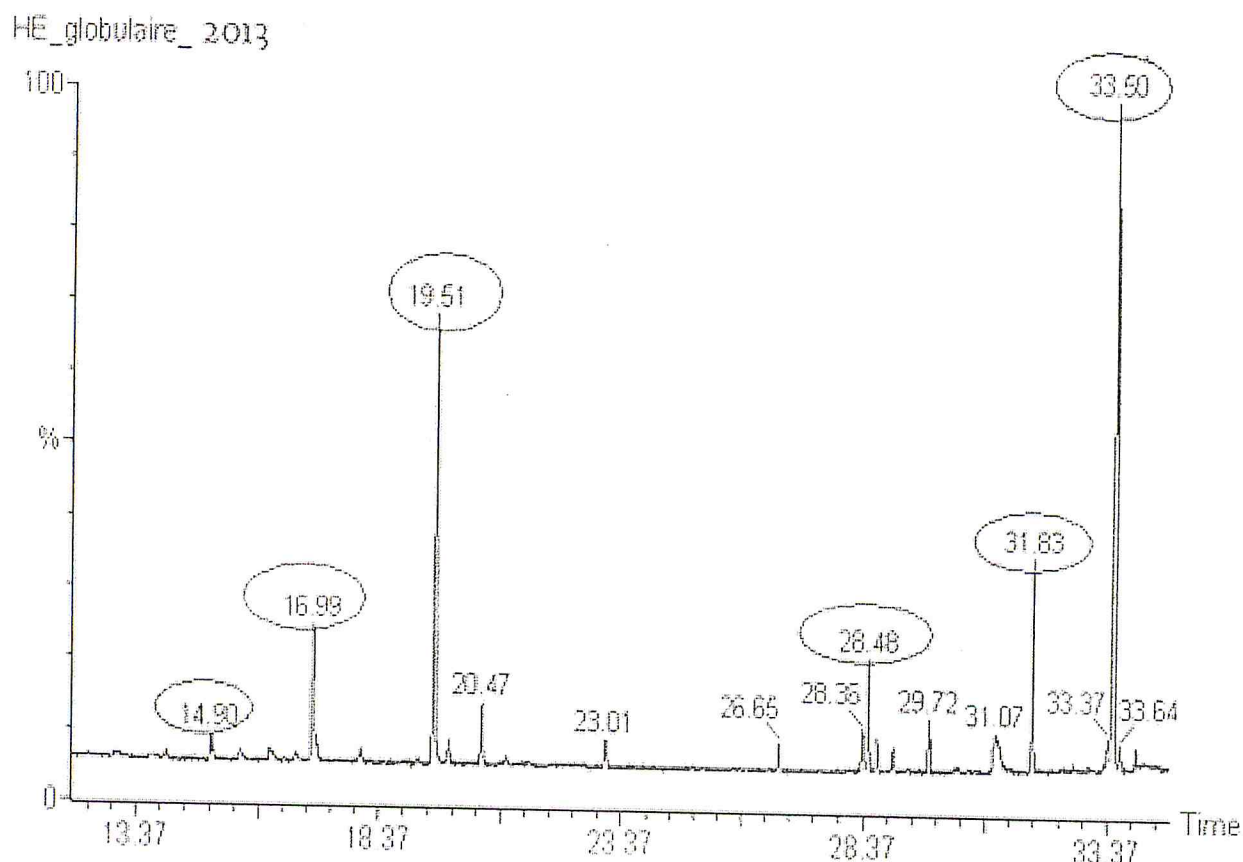


Figure 21 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *globularia alypum L.*

III-Tests phytochimiques

▪ Mise en évidence des flavonoïdes

Le test phytochimique réalisé sur l'extrait éthanolique a permis de mettre en évidence les flavonoïdes. La présence de ces derniers est indiquée par l'apparition d'une couleur rouge brique qui se développe après la réaction.



Figure 22 : mise en évidence des flavonoïdes.

▪ **Mise en évidence des tanins**

Le test phytochimique réalisé sur l'extrait aqueux et éthanologique a permis de mettre en évidence les tanins où la présence de ces derniers est indiquée par l'apparition d'une couleur verte foncée avec l'extrait aqueux et une couleur vert d'olive avec l'extrait éthanologique qui se développe après la réaction.

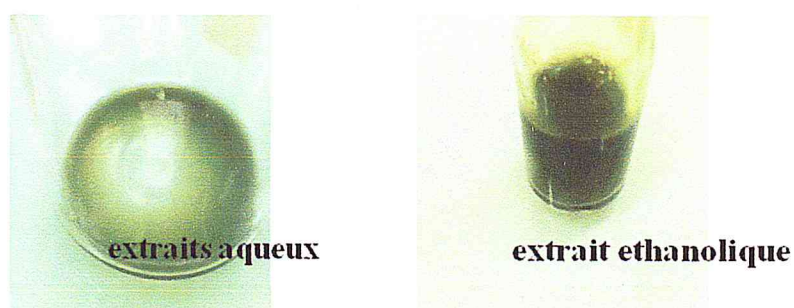


Figure 23 : mise en évidence des tanins.

IV- Extraction des Flavonoïdes

IV-1-Rendement en extrait flavonique à partir de *globularia alypum L*

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe des polyphénols réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante avec plus de 5000 composés déjà décrits.

Après le fractionnement par une série de solvants à polarité croissante de l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *globularia alypum*, quatre différents extraits ont été obtenus successivement: l'extrait brut (E-Br), l'extrait éther diéthylique (E-ET), l'extrait acétate d'éthyle (E-Ac) et l'extrait n-butanol (E-BuOH). La couleur, l'aspect ainsi que le

rendement de chaque extrait par rapport à 100 g de matériel végétal sec sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Aspects, couleurs et rendements des diverses fractions flavoniques extraites à partir de la partie aérienne de *globularia alypum L* en pourcentage par rapport à 100 g de matériel végétal sec.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement (%)
EBr	Pâte collante	Marron foncé	57,15
E-ET	Pâteux	Vert foncé	0,1236
E-Ac	Pâteux	Vert foncé	0,3023
E-BuOH	Pâteux	marron foncé	1,96

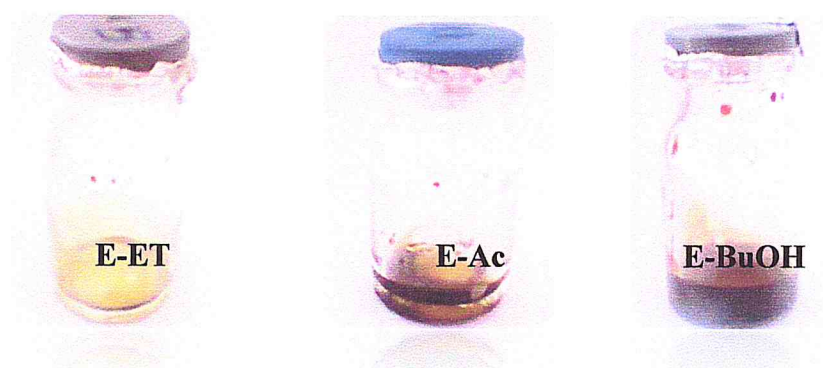


Figure 24 : Extrait E-ET, E-Ac et E-BuOH de *globularia alypumL*.

Les résultats obtenus montrent que parmi les différentes fractions de l'extrait brut, l'extrait E-BuOH représente le rendement le plus élevé (1,96%) par rapport au poids total de la poudre, suivi par l'E-Ac (0,3023%) puis l'E-ET (0,1236%). Cela est dû à la différence de polarité des différents solvants, le 1-butanol est plus polaire que l'acétate d'éthyle et l'éther d'éthylque.

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relative et semble être lié à l'origine géographique, aux conditions, à la durée du stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées [95].

L'utilisation d'une série de solvants à polarité croissante (Phase éther diéthylique, phase acétate d'éthyle, phase n- butanol) permet de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction et donc selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et tri-glycosylés) [96].

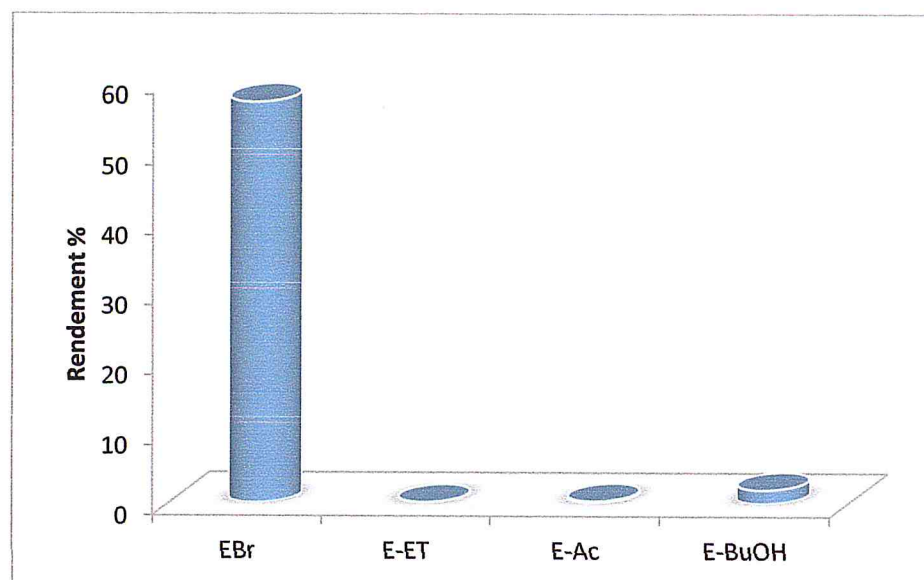


Figure 25 : Rendements (%) en extraits flavoniques étudiés de *globularia alypum L.*

Le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que le renouvellement de cette opération toute les 24 heures permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction [97].

V- Extraction des Tanins

V-1-Rendement en extrait tannique à partir de *globulariaalypum*

L'extrait Tannique de *globulariaalypum* est obtenu par macération dans un mélange acétone/eau suivi d'une extraction liquide-liquide par le dichlorométhane et par l'acétate d'éthyle. La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de l'extrait tannique par rapport à 2,5 g de matériel végétal sec sont représentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Aspects, couleurs et rendements de l'extrait tannique de la partie aérienne de *globulariaalypum L* en pourcentage par rapport à 2,5 g de matériel végétal sec.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement (%)
E-T	Visqueux	Jaune verdâtre	2.808

Le rendement en extrait Tannique (E-T) obtenu est égal à 2.808% par rapport au poids total de la poudre



Figure 26 : Extrait tannique de *globularia alypum L.*

VI- Analyse qualitative des extraits flavoniques et tannique par la chromatographie sur couche mince (CCM)

Nous avons opté pour cette technique dans le but de caractériser les différents constituants des extraits de *globularia alypum* où nous avons adopté le système de solvant suivant :

Système : Chloroforme/ méthanol/acide acétique/eau ; (40 : 6 : 0,1 : 0,2) (v : v : v : v), Ce système de migration a permis d'avoir une très bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots. La révélation est réalisée par deux méthodes: révélation chimique par H₂SO₄(Figure 26) et par l'observation sous lumière ultraviolette (à 254 nm) et (à 365 nm) (Figure 27). La révélation a permis d'avoir une visibilité acceptable des spots.

-Après le développement du chromatogramme et lorsque le front du solvant d'éluion a atteint la ligne supérieure, la plaque a été retirée, séchée, révélée par H₂SO₄ et examinée sous la lampe UV à 365nm et à 254 nm afin d'avoir une identification du nombre de constituants présents.

- Révélation chimique par H_2SO_4 :

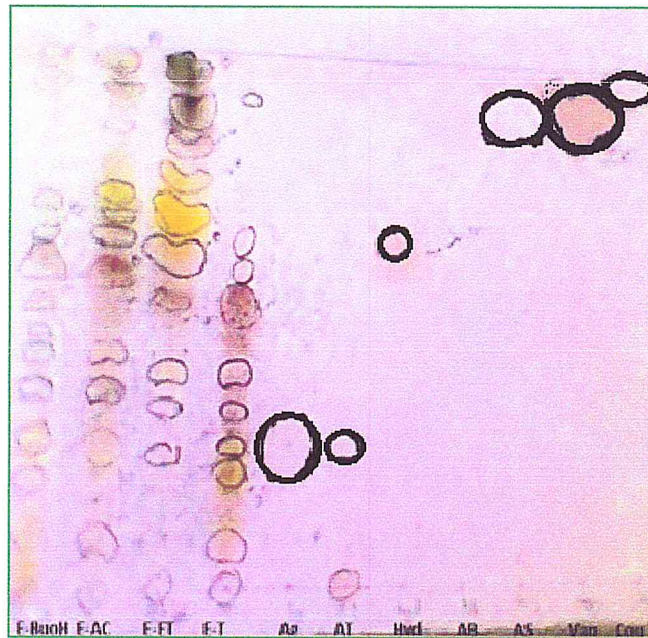


Figure 27: Chromatogrammes des extraits (flavoniques : E-ET, E-Ac ,E-BuOH et tannique : E-T) de *globularia alypum L* après révélation chimique par H_2SO_4 .

- Révélation physique par UV a 365 nm et a 254 nm :

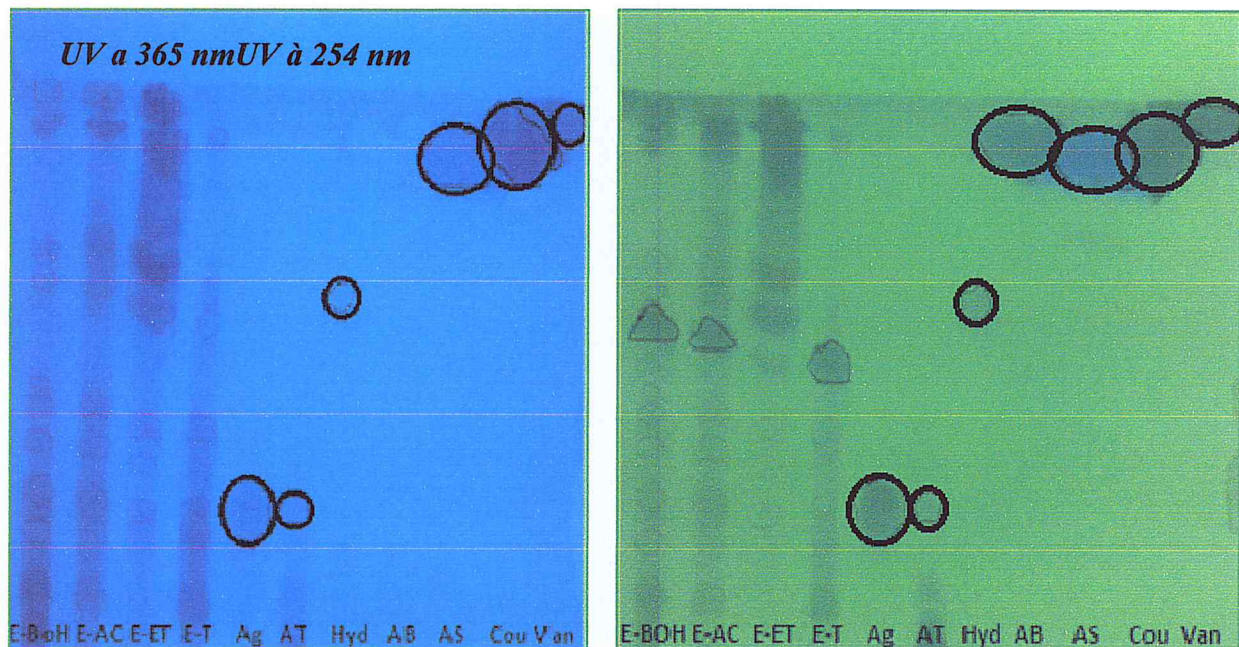


Figure 28 : Chromatogrammes des extraits (flavoniques : E-ET, E-Ac , E-BuOH et tannique : E-T) de *globularia alypum L* après révélation par l'UV .

-Pour le système du solvant utilisé et à travers les chromatogrammes présentés dans les figures 27 et 28, nous avons pu mettre en évidence treize composés pour la fraction butanolique, onze composés dans la fraction d'acétate d'éthyle, dix composés dans la fraction d'éther diéthylique et neuf fractions dans l'extrait Tannique.

Comme il est illustré sur les figures ci-dessus, nous avons déterminé le Rf de chaque spot et les résultats sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau 10: comportement chromatographique des extraits flavoniques de : E-ET, E-Ac ,E-BuOH et d'extrait tannique : E-T de *globularia alypum*L.

Extraits	Rf	Observation à 254 nm	Observation à 365nm
E-BuOH	0,041	Marron	Marron
	0,09	Marron	Marron
	0,19	Marron	Marron
	0,26	Marron	Marron
	0,35	Marron	Marron
	0,41	Marron	Marron
	0,45	Marron	Marron
	0,50	Marron	Marron
	0,59	Marron	-
	0,60	Marron	jaune orange
	0,70	Marron	Marron
	0,92	Marron	Marron
	0,97	Marron	jaune orange
	E-Ac	0,09	Marron
0,25		Marron	Marron
0,35		Marron	Marron
0,42		Marron	Marron
0,56		Marron	-
0,63		Marron	Jaune orange
0,67		Marron	Marron
0,72		Marron	jaune vert
0,84		Marron	Marron
0,92		Marron	Marron
0,97		Marron	Jaune orange
E-ET	0,22	Marron	Marron
	0,32	Marron	Marron
	0,40	Marron	Marron
	0,51	Marron	-
	0,60	Marron	Jaune orange
	0,70	Marron	Marron
	0,74	Marron	jaune vert
	0,80	Marron	jaune vert

	0,87 0,96	Marron Marron	Marron Jaune orange
E-T	0,074 0,20 0,25 0,30 0,38 0,50 0,57 0,63 0,91	Marron Marron Marron Marron Marron Marron Marron Marron Marron	Marron Marron Marron Marron Marron Marron Marron Marron Marron

Les valeurs des Rf des témoins utilisés (l'acide gallique, l'acide Tannique, l'hydroquinone, l'acide benzoïque, l'acide salicylique, vanilline, coumarine) pour le même système sont donné dans le tableau suivant.

Tableau 11: Comportement chromatographique des étalons : Ag, At, Hyd , AB, AS, Van , Cou.

étalons	Rf	Observation à 254 nm	Observation à 365nm	Observation après révélation par H ₂ SO ₄
Ag	0,24	Marron	Marron	Jaune très claire
AT	0,26	Marron	Marron	Jaune très claire
Hyd	0,63	Marron	Marron	Marron
AB	0,99	Marron	-	Jaune très claire
AS	0,88	bleu	Marron	Jaune très claire
Van	0,91	violet	Marron	Violet
Cou	0,97	Marron	Marron	Jaune très claire

NB : - absence.

-On remarque que les spots obtenus par les extraits flavoniques avec l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle, le n-butanol et l'extrait tannique révélé chimiquement et sous lumière UV sont nombreux, ce qui nous a permis de dire que ces extraits sont riches en composés flavonique et Tannique.

-La CCM nous a permis de déterminer la qualité de nos différents extraits, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis, elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs de nos extraits (fluorescence, coloration, facteur de rétention...).

-Il a été démontré qu'il existe une relation entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV sous forme de spots colorés. Le tableau résume la relation entre la fluorescence et la nature de produit.

Tableau 12: La relation entre la fluorescence et la nature de produit flavoniques [96]

La coloration	Type de flavonoïdes
Jaune pale	Dihydroflavonol
Jaune fluorescent	aurones avec OH libre en 4' chalcone avec OH en 2 ou en 4
Jaune vert brillant	aurones sans OH libre en 4' flavanones sans OH libre e 5
Jaune orange	Flavonols avec ou sans OH libre en 5

VII- Analyse qualitative des extraits flavoniques et tannique par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

Les extraits flavoniques: E-ET, E-Ac, E-BuOH et l'extrait tannique : E-T issues de la partie aérienne de *globularialypum* ont été analysés par HPLC. La phase mobile utilisée est un mélange binaire de solvants en mode isocratique: méthanol/eau 60/40(v/v). L'acide Tannique, l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide caféique, la catéchine, et la rutine, ont été utilisés comme des témoins.

Les chromatogrammes des témoins et des extraits E-ET, E-Ac, E-BuOH et E-T sont représentés dans l'annexe 4. Ces flavonoïdes ont été identifiés en comparant leurs comportements chromatographiques avec ceux des témoins par comparaison du temps de rétention. Les résultats sont donnés dans les tableaux suivants:

Tableau 13 : Temps de rétention des témoins

Témoin	Temps de rétention (mn)
Acide Tannique	2,233
Acide benzoïque	3,000
Acide salicylique	3,217
Acide caféique	3,292
Catéchine	2,858
Rutine	3,8

Tableau 14: Temps de rétention des différents extraits obtenus par la séparation avec HPLC

Différents extraits	Temps de rétention	Composés probables
E-ET	3,008	Acide benzoïque
	4,842	-
	7,492	-
	10,050	-
E-Ac	2,992	Acide benzoïque
	3,825	Rutine
	4,600	-
	7,642	-
	8,233	-
	16,042	-
E-BuOH	1,817	-
	2,917	catéchine
	3,792	Rutine
	7,492	-
	12,567	-
	16,075	-
E-T	1,925	-
	2,925	catéchine
	3,783	Rutine
	7,250	-

- : non identifié.

Après comparaison des temps de rétention des extraits avec ceux des témoins, on constate que l'E-BuOH et l'E-T semble contenir la catéchine et la Rutine, nous avons pu identifier la présence de la rutine et l'absence de la catéchine chez l'E-AC. Par contre l'E-ET n'a présenté aucun de nos témoins flavoniques.

Ainsi nous observons la présence de l'acide benzoïque chez les deux extraits : l'E-ET et l'E-Ac de *globularia alypum*.

VIII-Dosage des polyphénols totaux

Les composés phénoliques forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes. Et comme la majorité des effets pharmacologiques des plantes sont dû à ces substances, un dosage des polyphénols totaux des quatre extraits (E-ET, E-Ac, E-BuOH et E-T) de *globularia alypum* a été effectué pour évaluer les teneurs. La méthode de dosages des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. Les résultats sont représentés dans le tableau 15 et la gamme d'étalonnage dans les Figures 29.

Tableau 15: Les teneurs en polyphénols totaux dans les différents fractions de *globularia alypum L* (exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique /g d'extrait).

Extraits	Teneur en polyphénols (mg EAG/g d'extrait)
E-ET	28,86 ± 1,62
E-Ac	12,49±0,14
E-BuOH	0,694± 0,023
E-T	34,68±0,29

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe droite d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

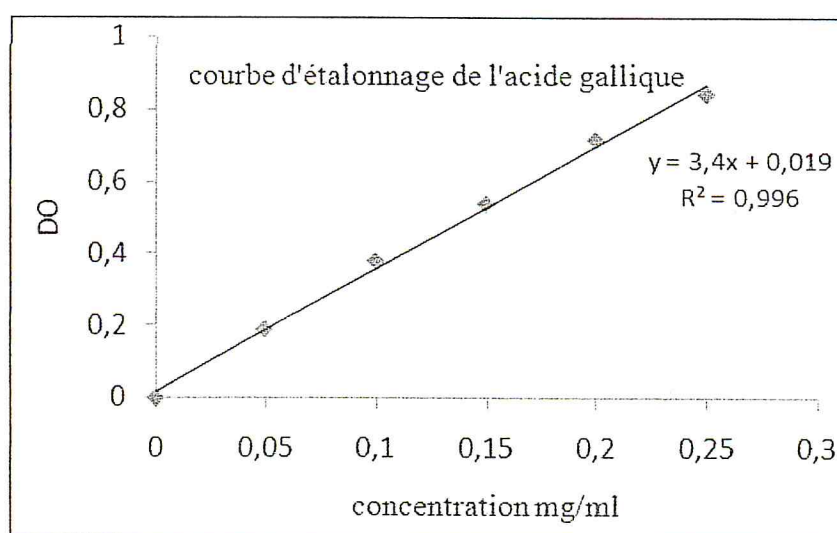


Figure 29 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'extrait tannique contient $34,68 \pm 0,29$ mg EAG/g d'extrait. Cependant, les extraits flavoniques représentent les valeurs les moins importantes en polyphénols, dont l'extrait d'éther diéthylique représente la fraction phénolique la mieux représentée avec une valeur de $(28,86 \pm 1,62)$ mg EAG/g d'extrait) suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle ($12,49 \pm 0,14$ mg EAG/g d'extrait), alors que l'extrait butanolique ne contient que $(0,694 \pm 0,023)$ mg EAG/g d'extrait).

Ces résultats ont été comparés à ceux trouvés par Djeridane.A et coll [26] en Algérie, qui ont montré que la teneur en polyphénols enregistrés chez l'extrait hydroéthanolique de *globularia alypum* l'était égale à $21,54 \pm 0,81$ mg EAG/g de la plante. Ce qui est aussi différent à celle trouvée par DaycemKhlifi et coll[10] avec des valeurs qui varient de $8,50 \pm 0,10$ g EAG /Kg à $139,95 \pm 3,40$ g EAG /Kg de la plante dans les différents extraits de cette plante. De même Riadh Ben Mansour et coll[20] ont étudié les extraits hydroéthanoliques à partir de feuilles de *globularia alypum* où ils ont trouvé que la concentration des composés phénoliques est de $247,24 \pm 5,09$ en (mg EAG /g matière sèche).

Cette différence résulte vraisemblablement du fait que le dosage par le réactif Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec ce réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé [98]. En effet, la teneur en polyphénols totaux n'est pas stable et se diffère d'une plante à une autre. Elle peut être influencée par plusieurs paramètres tels que : la nature chimique de ces composés, la méthode d'extraction utilisée, la dimension des particules d'échantillon et le temps d'extraction. Une autre difficulté doit être prise en considération qui est la susceptibilité des polyphénols à l'oxydation. Chaque matériel végétal a ses propriétés uniques en termes d'extraction de ces composés [99].

IX- Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de *globularia alypum* en utilisant comme standard la quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/g}$ d'extrait). Les résultats sont exprimés en μg équivalent quercétine par g d'extrait et elles sont résumées dans le tableau 16 et représentées dans la figure 30.

Tableau 16: les Teneurs en flavonoïdes totaux exprimées en μg équivalent quercétine /g d'extrait (moyenne des trois mesures).

Extraits Flavonique	Teneur en flavonoïdes (μg EQ/g d'extrait)
E-ET	$873,65 \pm 5,54$
E-Ac	$284,60 \pm 1,82$
E-BuOH	$46,56 \pm 0,31$

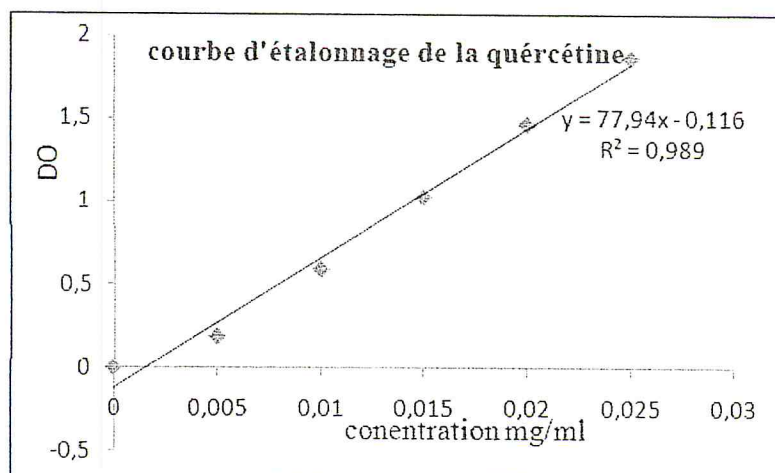


Figure 30: Droite d'étalonnage de la quercétine.

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium dans les extraits flavoniques révèle que l'extrait d'éther diéthylique est le plus riche en flavonoïde avec une teneur de ($873,65 \pm 5,54\mu\text{g}$ EQ/mg d'extrait). Par la suite vient l'extrait d'acétate ($284,60 \pm 1,82\mu\text{g}$ EQ/mg d'extrait) suivi par l'extrait butanolique ($46,56 \pm 0,31\mu\text{g}$ EQ/mg d'extrait). Si on compare nos résultats à ceux de dosage des polyphénols, on remarque le même ordre décroissant des extraits (EET >EAc> E-BuOH) en terme de teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes.

Ces résultats sont différents à ceux trouvés par Djeridane.A et coll[26]en Algérie, qui ont montré que la teneur en flavonoïdes trouvé chez l'extrait hydroéthanolique de *globularia alyppum* était égale à $4,54 \pm 0,09$ mg EQ /g de la plante. Ce qui est aussi différent à ceux trouvés par DaycemKhlifi et coll[10] avec des valeurs qui varie de $0,31 \pm 0,02$ g EQ /Kg a $19,29 \pm 0,04$ g EQ /Kg de la plante dans les différents extraits de la même espèce. De même Riadh Ben Mansour et Coll[20] ont étudié les extraits hydroéthanoliques à partir de feuilles *globularia alyppum* où il ont trouvé que la concentration des composés flavoniques est de $78,82 \pm 2,09$ en (mg EQ /g matière sèche).

L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation entre la teneur de l'extrait en flavonoïdes et en composés phénoliques.

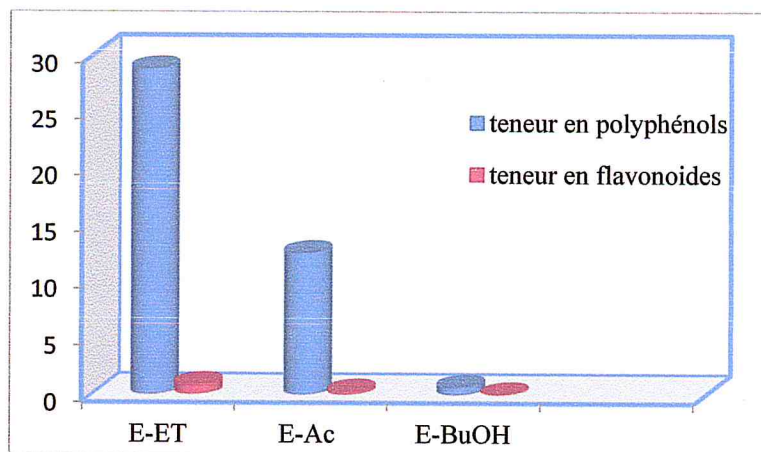


Figure 31 : teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits flavoniques.

X-Dosage des tanins

La méthode à la vanilline en milieu acide est utilisée pour quantifier les tanins dans l'extrait tannique de *globularia alypum* en utilisant comme standard la catéchine. La teneur en tanins est exprimée en milligramme d'équivalent de catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g d'extrait). Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par g d'extrait et elles sont résumés dans le tableau 17 et représentés dans la figure 32.

Tableau 17: Teneurs en Tanins exprimées en mg équivalent catéchine /g d'extrait (moyenne des trois mesures).

Extrait Tannique	Teneur en Tanins (mgEC/g d'extrait)
E-T	16,48± 6,36

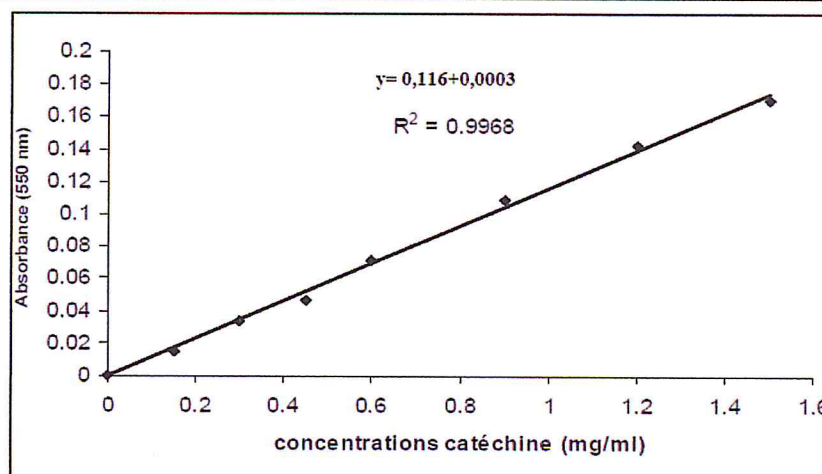


Figure 32 : Droite d'étalonnage de la catéchine.

La détermination quantitative des Tanins par la méthode à la vanilline en milieu acide dans l'extrait tannique révèle que seulement ($16,48 \pm 6,36$ mg EC/g d'extrait) est trouvé dans cet extrait.

Ce résultat est différent à ceux de Daycem Khelifi et coll (2011) qui ont trouvé des teneurs variables en tanins dans l'extraits méthanolique,acétonique, éthylique et dichlorométhanique exprimé en g EC /Kg de la plante dont les valeurs sont respectivement : ($1,40 \pm 0,06$), ($2,79 \pm 0,07$), ($5,73 \pm 0,06$) et ($18,65 \pm 0,11$).

En tenant compte de la distribution des métabolites secondaires qui peut varier pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques extrêmes (température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité, etc.) qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les flavonoïdes. En plus, la teneur en tannins d'une plante varie en fonction de plusieurs facteurs intrinsèques, tels que l'espèce et la variété, la partie ou le stade végétal et les facteurs extrinsèques comme les conditions climatiques. De même, Pour une espèce végétale donnée, les différents organes peuvent présenter des équipements phénoliques très différents [100].

L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation entre la teneur de l'extrait en Tanins et en composés phénoliques.

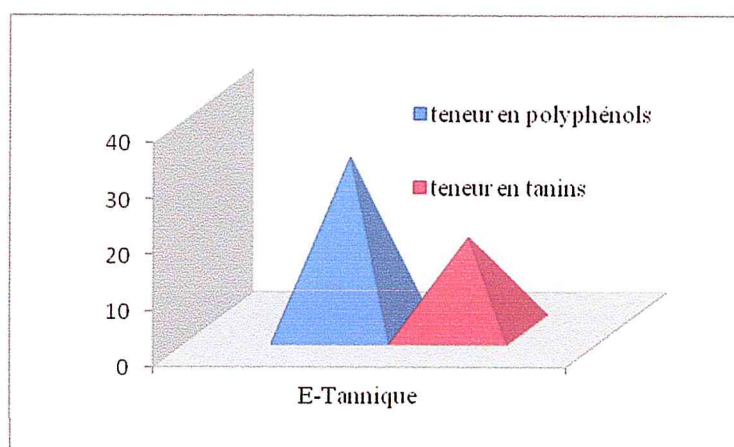


Figure 33 : teneur en polyphénols totaux et en Tanins d'extrait Tannique.

Toutefois, il est important de signaler que l'utilisation de différentes méthodes d'extraction et de quantification réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études [101].

XI- Evaluation des activités biologiques

XI-1- Evaluation de l'activité anti oxydante

Nous avons étudié l'activité antioxydante de l'HE et des extraits flavoniques et tannique de la plante étudiée afin de préjuger et localiser la fraction la plus active. La capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires. Les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes présentées dans les figures ci-dessous.

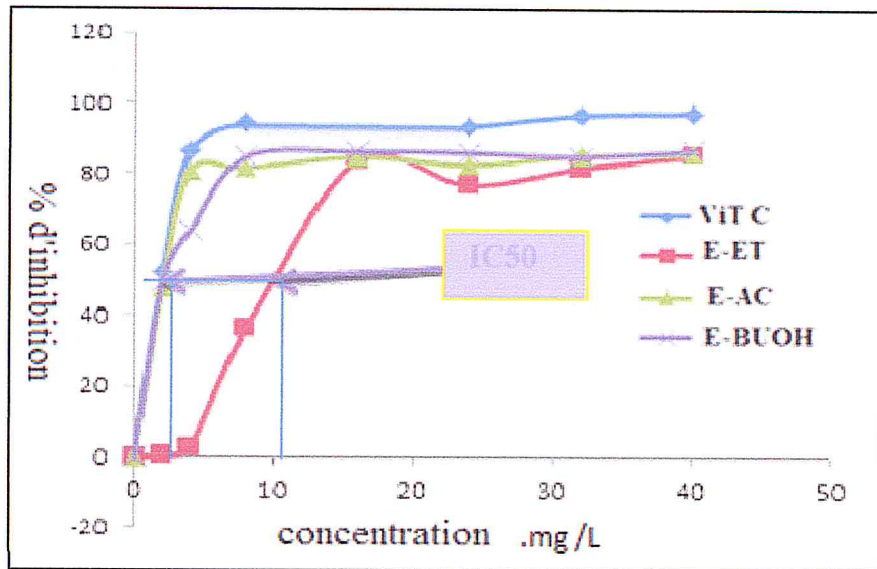


Figure 34 : pourcentage d'inhibition de DPPH par les différentes fractions flavoniques.

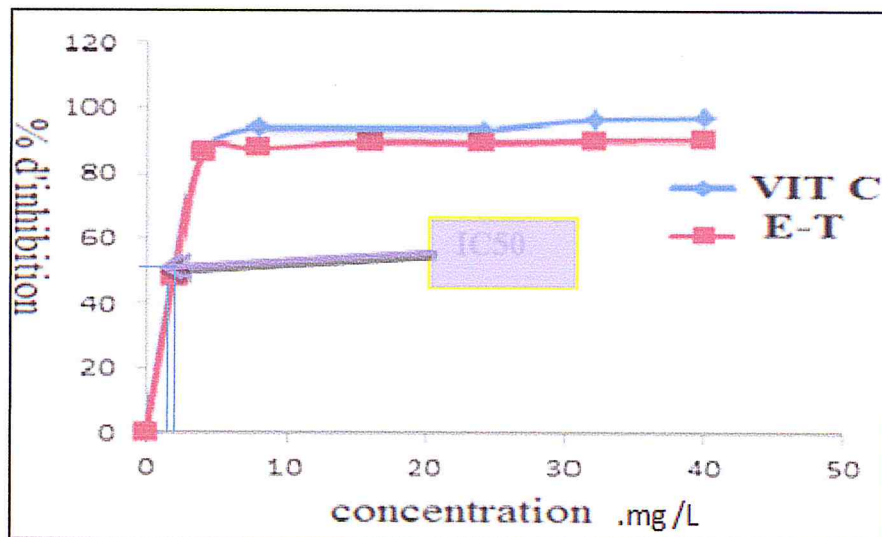


Figure 35 : pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extract Tannique.

D'une manière générale, tous les extraits testés ont provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance 517nm selon leur concentration.

A partir des résultats obtenus et pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit le paramètre IC50 où les valeurs d'IC50 des extraits : E-ET, E-AC, E-BUOH, et l'E-ET de *globularia alypum* sont enregistrés dans le tableau 18 et dans la figure36.

Tableau 18 : valeurs des IC50 établies pour chaque extrait ainsi que celle de l'acide ascorbique.

Echantillon	IC50 mg/l
Acide ascorbique	0,46
E-ET	10,92
E-AC	0,57
E-BUOH	1,11
E-T	0,515

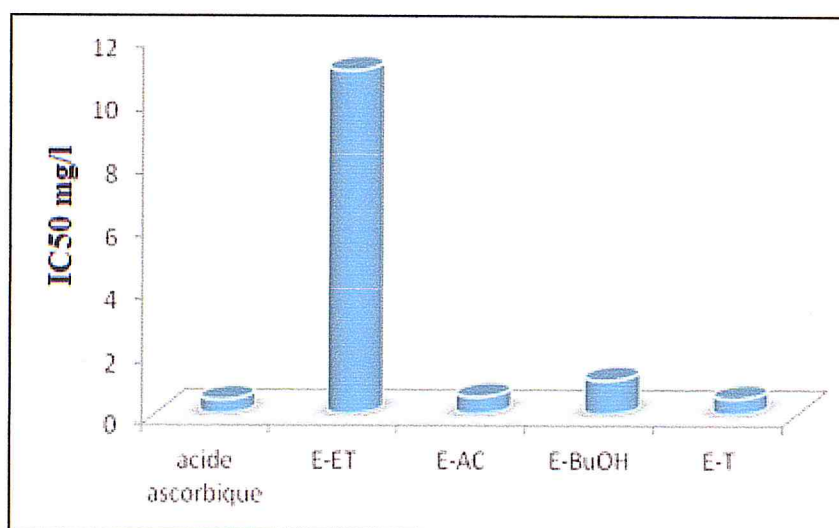


Figure 36 : Les IC50 des différents extraits de *globularia alypum* et de l'acide ascorbique.

À des fins comparatives un antioxydant standard est utilisé; l'acide ascorbique. Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec une IC50 de l'ordre de 0,46mg/l. Parmi les quatre extraits de *globularia alypum L*, l'E-T représente l'extrait le plus actif avec une IC50 de 0,515mg/l. Suivi par l'E-AC avec une IC50 de 0,57mg/l et l'E-BUOH avec une IC50 de 1.11mg/l, l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par l'E-ET (IC50= 10.92mg/l).

Il a été démontré par DaycemKhlifi et coll, 2011 que l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique était supérieure à celle de tous les autres échantillons testés, avec une valeur IC50 de 15,58 mg / L, suivie par l'extrait de l'acétone ($20,33 \pm 0,61$ mg / L). D'autre part, une pauvres activité antiradicalaire a été présenté par les extraits préparés avec de l'éther de pétrole ou le dichlorométhane (285,22 mg / L et 512,05 mg / L, respectivement) par rapport à la vitamine C (3,89 mg / L). Par ailleurs, Riadh Ben Mansour et al en 2012 ont trouvés dans l'extrait hydroéthanolique de *Globularia alypum* une valeur de CI50 qui égal à 6.45 $\mu\text{g/ml}$ par rapport à la BHT (8,31 $\mu\text{g/ml}$).

L'activité anti-radicalaire des extraits est donc relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux. On remarque que l'E-T qui représente l'extrait le plus riche en polyphénols, possède l'effet antioxydant le plus puissant par rapport aux autres extraits. Par contre en comparaison avec les extraits flavoniques : l'E-AC et l'E-BUOH les fractions les plus pauvres en flavonoïdes ont révélé une activité beaucoup plus importante que l'E-ET qui plus riche en flavonoïdes.

Et dans le but d'identifier les sites potentiels au sein des flavonoïdes qui sont responsables sur l'effet scavenger vis-à-vis du radical DPPH, plusieurs travaux ont étudié la cinétique et le mécanisme réactionnel des flavonoïdes avec ce radical stable. Ils ont mis en évidence la relation structure fonction de 29 flavonoïdes (flavones, flavonols et flavanones) et leurs capacités de piéger le DPPH. Les résultats de cette étude ont montré que les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements 3',4'-dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3-OH sur le cycle C [102].

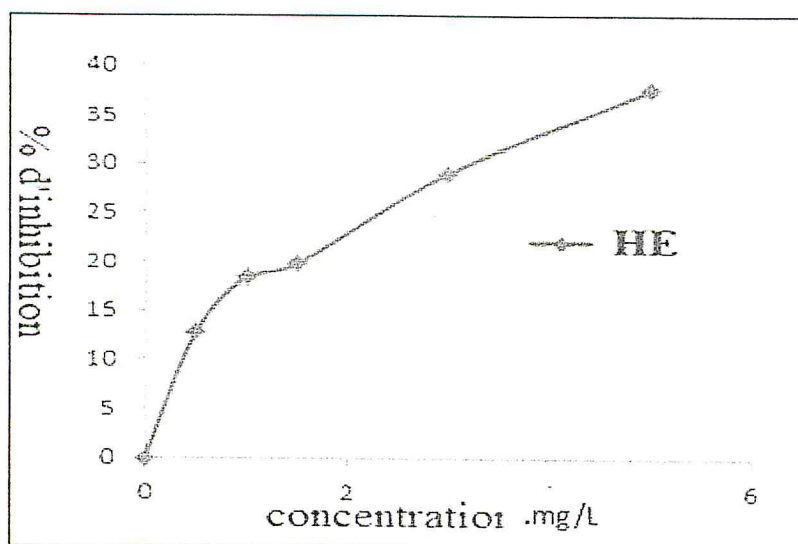


Figure 37 : pourcentage d'inhibition de DPPH par l'huile essentielle.

D'après nos observations, l'HE a provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 517 nm selon des concentrations faibles. Mais le % d'inhibition obtenu a été inférieur à 50% à cause des faibles doses d'HE utilisées dans cette expérience, d'où nous n'avons pas pu calculer le paramètre IC50 et de lui comparer à ceux de l'antioxydant standard (l'acide ascorbique).

XI-2- Evaluation de l'activité antimicrobienne

La méthode utilisée pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de l'HE et des extraits flavoniques et tannique de l'espèce végétale *globularia alypum* vis-à-vis de quelques souches bactériennes est la diffusion sur gélose Mueller-Hinton pour les bactéries. Grâce à sa spécificité et à sa composition, ce milieu permet une bonne croissance aux bactéries-tests tout en offrant des résultats clairs. De même que pour le milieu Sabouraud pour les levures. La lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque.

Le tableau 19 indique les diamètres de zones d'inhibition de HE et des différents extraits vis-à-vis les souches étudiées.

Tableau 19 : diamètre des zones d'inhibition des fractions des extraits flavoniques : l'EET, l'EAc ,BuOH ,d'extrait tannique E-T et d'HE .de *globularia alypum L*(mm).

échantillons souches	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilus</i>	<i>Candida albicans</i>
E-ET	10	12	-	16	17
E-Ac	10	10	-	11	-
E-BuOH	-	-	-	10	-
E-T	10	-	-	-	-
HE	-	14	-	-	-

NB : - Non inhibitrice.

L'utilisation de l'extrait d'éther diéthylique de *globularia alypum* sur les bactéries a donné un diamètre plus au moins important : 12mm en présence de *S.aureus* et 16mm pour *B. subtilus* représentant le diamètre le plus élevé.

Par contre l'effet antibactérien est presque nul vis -à-vis de *P.aeruginosa* dont le diamètre de 10 mm. *Candida albicans* reste l'espèce fongique la plus sensible à l'action inhibitrice de l'extrait d'éther diéthylique.

En effet, la croissance de cette levure a été inhibée d'un diamètre de (17 mm). Ceci démontre que l'extrait flavonique de la fraction d'éther à une action fongicide puissante sur cette espèce. Ce qui indique que l'activité antifongique dépend du solvant utilisé pour l'extraction [98].

Par contre la souche, *E. coli* présente une résistance vis -à-vis de tous les extraits et de l'HE étudiées.

-L'extrait acétate d'éthyle est légèrement actif sur *B. subtilus* avec un diamètre de 11 mm, et présente une zone d'inhibition de 10 mm donnant un effet antibactérien presque nul vis -à-vis de *S.aureus* et *P.aeruginosa* .

-L'extrait butanolique de *globularia alypum* s'est avéré inactif contre l'ensemble des souches testés sauf *B. subtilis* avec un diamètre de 10 mm.-L'extrait Tannique de *globularia alypum* n'a aucun effet inhibiteur sur l'ensemble des souches testés sauf avec *P.aeruginosa* où il présente un effet antibactérien presque nul d'un diamètre de 10 mm.

- Concernant l'activité de l'HE de *globularia alypum* sur les bactéries et la levure utilisées, il apparaît que cette HE présente une action inhibitrice seulement vis-à-vis *S.aureus* avec une zone d'inhibition de 14 mm, par contre, les autres bactéries ainsi que la levure ont manifesté une résistance vis-à-vis de cette dernière.

Une échelle de mesure de l'activité antimicrobienne classant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne en quatre classes :

1. Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de $ZI \geq 28$
2. Modérément inhibitrice lorsque : $16\text{mm} \leq \text{diamètre de } ZI \leq 28$
3. L'égerment inhibitrice lorsque : $10\text{mm} \leq \text{diamètre de } ZI \leq 16$
4. Non inhibitrice lorsque le diamètre de $ZI \leq 10\text{mm}$

Les résultats obtenus selon l'échelle de mesure de l'activité antimicrobienne on constate que l'E-ET est Modérément inhibiteur vis-à-vis des souches testées. Tandis que les autres échantillons testés sont l'égerment inhibiteurs.

En comparant nos résultats avec une autre étude récente publiée en 2012 par F. Bouabdelli, où il a rapporté des résultats similaires aux nôtres, alors que ces tests ont été réalisée sur des extraits obtenue par infusion, décoction, macération et percolation de cette même plante algérienne trouvant que les extraits sont l'égerment inhibiteurs vis-à-vis des souches testées. Prouvant ainsi que les résultats sont en concordance avec ceux de notre étude.

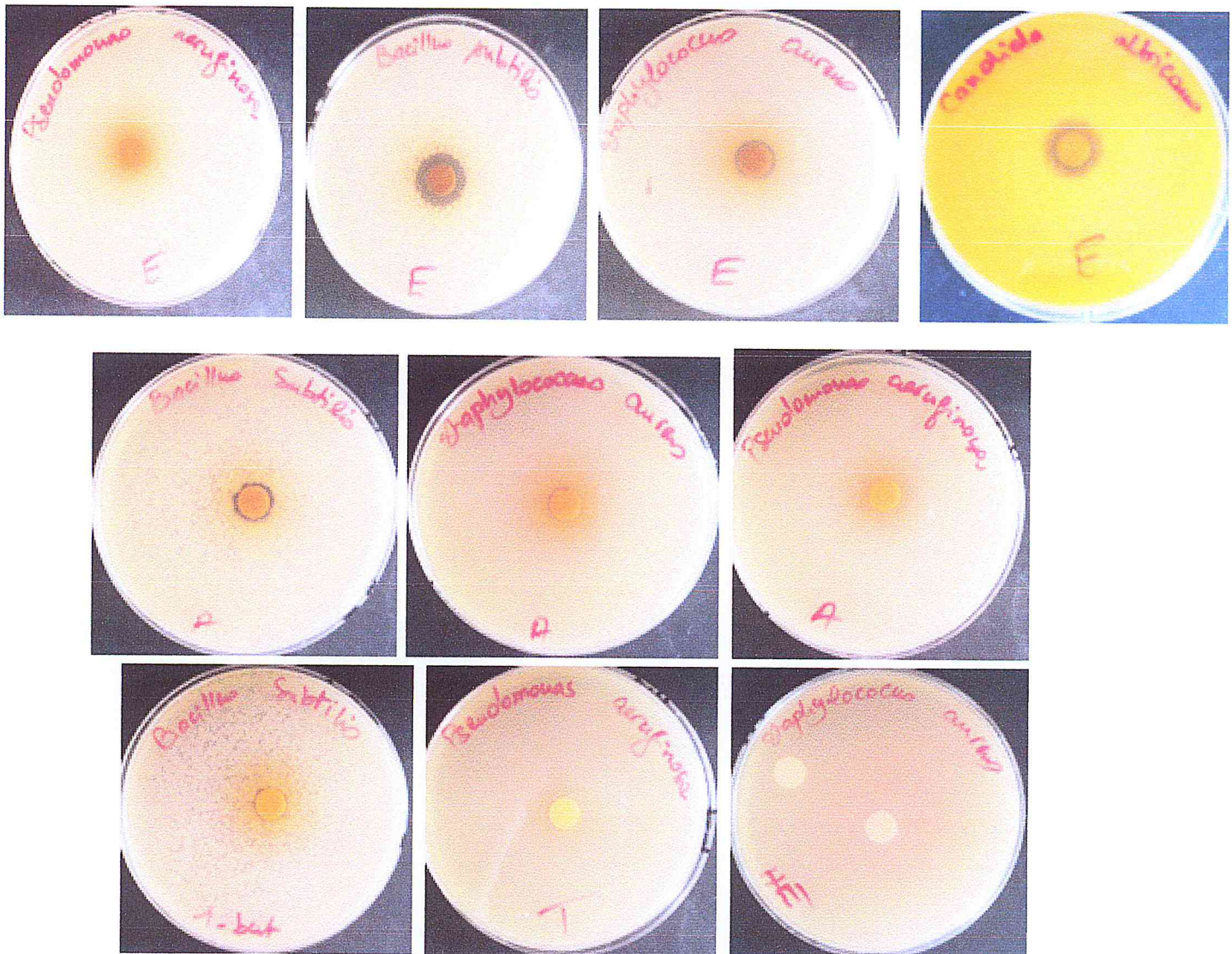


Figure 38 : Diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes par les extraits actifs de *globularia alypum L.*

XI-3- Evaluation de l'activité anti inflammatoire

Globularia alypum est une plante utilisée par la médecine traditionnelle pour traiter l'inflammation. Bien qu'elle soit efficace, il est nécessaire d'établir des bases scientifiques d'un traitement traditionnel avec cette plante. C'est dans ce but que nous nous sommes intéressés à évaluer au laboratoire l'activité anti-inflammatoire de l'extrait flavonique (fraction butanolique) de *globularia alypum*. Les expériences ont été réalisées sur le modèle de l'œdème de la patte de souris induit par la carragénine (Test de Levy). Dans ce contexte nous avons estimé l'œdème en fonction du poids de la patte gauche (patte testé) par rapport à la patte

droite (patte témoin) de la souris. Les variations des poids moyens des pattes de souris traitées sont rapportées dans le Tableau suivant.

Tableau 20: Moyenne des poids entre la patte gauche et droite des souris.

	Témoin	Référence	Essai 1(1%)	Essai 2(2%)	Essai 3(3%)
Souris 1	0,0369	0,0155	0,0421	0,0335	0,0278
Souris 2	0,0212	0,0171	0,0257	0,0238	0,0346
Souris 3	0,0294	0,0210	0,0169	0,0296	0,0307
Souris 4	0,0400	0,0205	0,0331	0,0326	0,0328
Souris 5	0,0274	0,0179	0,0377	0,0267	0,008
Souris 6	0,0310	0,0309	0,0263	0,0138	0,000
Moyen du poids des pattes des 6 souris (g)	0,0310	0,0200	0,0303	0,0266	0,0223

Nos observations concernant le volume de l'œdème indique que son augmentation est plus importante chez le lot traité par l'eau que chez les lots traités avec l'extrait de la plante et la référence. Le tableau 10, montre que la carragénine entraîne une augmentation de 0,031g du poids de la patte des souris, pour lot témoin. L'administration orale de l'acide acétylsalicylique à la dose de 2mg/ml prévient l'augmentation du poids de la patte de souris, elle est de 0,02g. Une augmentation moindre a été observée après l'administration de la fraction butanolique à la dose de 0,1g/ml, 0,2g/ml et 0,3g/ml, d'ordre de 0,0303, 0,0266 et 0,0223 respectivement.

Pour mieux comprendre l'effet de notre extrait sur cette inflammation, nous avons calculé le pourcentage de l'œdème et le pourcentage de réduction de l'œdème, les résultats sont consignés dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Pourcentage de l'œdème et le pourcentage de réduction de l'œdème.

	Témoin	Référence	Essai 1(1%)	Essai 2(2%)	Essai 3(3%)
% œdème	25,60%	15,42%	23,41%	18,65%	17,15%
%réduction de l'œdème	-	39,76%	8,55%	27,15%	33,01%

Après quatre heures de l'injection de la carragénine, Le pourcentage de l'œdème (l'état inflammatoire) est de 25,60% chez le lot témoin. Cependant, la fraction butanolique de la globulaire administrée à 0,1g/ml, 0,2g/ml et 0,3g/ml, a réduit le volume de l'œdème par rapport aux témoins, avec 23,41% , 18,65%et 17,15% respectivement.

L'évaluation du pourcentage de réduction de l'œdème montre que, la fraction butanolique de la globulaire à la dose de 0,1g/ml, présente un pourcentage de réduction de 8,55%, il manifeste un effet nettement inférieur à celui engendré par l'acide acétylsalicylique(39,76%). A la dose de 0,2g/ml, la fraction butanolique de la globulaire possède une activité anti-inflammatoire importante avec un pourcentage de réduction de (27,15%), alors qu'avec la troisième dose de 0.3g/ml, l'activité antiinflammatoire est plus importante marquant un pourcentage de réduction de 33,01% proche à celui obtenu avec l'acide acétylsalicylique (référence).

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait flavonique de globulaire peut être attribuée à sa composition chimique, c'est-à-dire la présence de telles molécules actives dans les plantes qui constituent la source de traitement. En effet, plusieurs études révèlent que généralement, les composés impliqués dans l'activité antiinflammatoire des plantes comprennent les dérivés polyphénoliques, les stérols et les triterpènes [103].

Des recherches scientifiques ont mis en évidence la capacité des flavonoïdes présents dans les plantes à diminuer la réaction inflammatoire. La variabilité structurale des flavonoïdes amène à de multiples mécanismes d'action [104,105]. En limitant la réaction inflammatoire, les flavonoïdes agissent comme protecteur de la matrice dermique en inhibant l'activité de certaines enzymes [104].

XI-4- Evaluation de l'activité antalgique

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'activité antalgique de l'extrait flavonique (fraction butanolique) de *globularia alypum* chez les souris par la méthode de la douleur chimique provoquée par l'acide acétique (Test de torsion). Dans ce contexte nous avons compté pour chaque souris le nombre de crampes. Les résultats du nombre de crampe enregistré chez les souris dans chaque lot, les pourcentages de protection de l'extrait flavonique, et de la référence vis-à-vis de la douleur chimique provoqué par l'acide acétique sont rapportés dans le tableau suivant.

Tableau 22 : Nombre de crampes/ souris observé pendant 10 min et le pourcentage de réduction de crampes.

	Témoin	Référence	Essai 2(2%)	Essai 3(3%)
Souris 1	3	1	1	1
Souris 2	11	1	1	0
Souris 3	18	0	28	1
Souris 4	16	2	1	1
Souris 5	13	1	2	0
Souris 6	6	1	10	0
moyennes des crampes	11,17	1	7,16	0,5
%de protection	-	91,047	35,90	95,52

Les résultats obtenus à l'issue du test d'activité antalgique révèle qu'après 5 min de l'injection d'acide acétique par voie intrapéritonéale, l'effet douloureux de ce dernier, est apparu sous forme des crampes chez les souris. Le tableau 22 nous permet de constater que le lot témoin montre un nombre moyen de crampes égal à 11 crampes/10 min. Le nombre de crampes enregistré chez le lot traité par le Paracétamol (produit de référence) est de 1, avec un pourcentage de protection de 91,047%. Nous pouvons dire que le Paracétamol supprime presque complètement les crampes induites par l'acide acétique.

La dose de 0.2g/ml de l'extrait réduit légèrement le nombre de crampes avec un nombre moyen de 7,16 crampes/10min et un pourcentage de protection de 35,90%. La dose de 0,3g/ml d'extrait

s'avère plus efficace, avec un nombre moyen de ½ crampes/10min, et un pourcentage de protection de 95,52% plus élevé que celui obtenue par le Paracétamol (produit de référence).

À la lecture des résultats chromatographique de notre extrait, nous pouvons justifier l'activité antalgique de cet extrait par la présence des flavonoïdes dans sa composition chimique. Nos résultats posent les bases scientifiques de l'utilisation de *globularia alypum* pour son effet antalgique.

XII- Analyse de quelques éléments minéraux de *globularia alypum L* par activation neutronique

Les résultats d'analyse obtenus par activation neutronique renferment la fraction massique des éléments identifiés et qui sont représenté dans le tableau 23.

Tableau 23:fraction massique des éléments identifiés chez *globularia alypum*.

Elément	Fraction massique
Br	6,45 ±0,06mg/Kg
As	102,3 ±9,8µg/Kg
Na	353 ±12,3mg/Kg
K	7,24 ±0,02g/Kg
Fe	300 ± 32 µg/g
Zn	12,1 ± 1,6 µg/g

Le Tableau 22 révèle que le contenu en potassium et en sodium dans les échantillons sont très élevés (7,24 g/Kg,353 mg/Kg) respectivement. Suivi des autres éléments (Fe300 µg/g),Zn (12,1 µg/g),(Br 6,45 mg/Kg) classés par ordre décroissant. Tandis que l'Arsenic (102,3 ±9.8µg/Kg) est l'élément le plus abondant dans *globularia alypum*.

Ces résultats ont montré que *globularia alypum* est une bonne source de K et Ca. Notant que les variations de teneurs en minéraux peuvent avoir une certaine relation Avec l'environnement [106].

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs.

Notre étude s'est orientée vers la valorisation d'une plante médicinale *globularia alypum* (le globulaire) en vue de son utilisation dans la médecine traditionnelle comme un anti-inflammatoire, antalgique, antidiabétique et anti-ulcère. Cette plante récoltée de la région de Hamame melwane mekta3 Lazrak (Blida). Elle est exploitée à l'échelle laboratoire en vue de l'extraction de ses huiles essentielles et de ses composés poly phénoliques : flavonoïdes et Tanins.

Le rendement en HE obtenu par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau de la partie aérienne de la plante est de l'ordre de 0,0018%. Cette HE présente une odeur très forte caractéristique.

L'analyse chromatographique d'HE a été analysé par CG-SM, a révélé que le profil chromatographique de cette HE est caractérisé par la présence de l'héxadécanoite d'éthyle (35,24%), suivi par le Cinnamate d'éthyle (23,80%), l'acide pentadécanoïque, 14methyl, méthyle ester (11,01%), le Cinnamate de méthyle (7,05%) et le décanoate d'éthyle (5,73%). Le composé 2-Methoxy-4-vinylphenol (1,80%) présentait la fraction minoritaire.

Les tests phytochimiques réalisés par les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence des flavonoïdes et des tanins.

La détermination du rendement en composés phénoliques notamment les flavonoïdes (fraction éther d'éthylique, acétate d'éthyle et 1-butanol) a montré la richesse des extraits secs de l'espèce *globularia alypum* dont le rendement le plus remarquable est celui de la fraction butanolique(1,96%), suivi de la fraction acétate d'éthyle(0,3023%) et la fraction éther d'éthylique (0,1236%). tandis que, l'extrait tannique a permis d'obtenir un rendement de (2.808%).

En outre, l'analyse qualitative des flavonoïdes des trois fractions éther di éthylique, acétates d'éthyle et 1-butanol ainsi que l'extrait Tannique par chromatographie sur couche mince grâce au système d'élution choisi nous a permis tout d'abord d'avoir des empreintes flavoniques et Tannique et nous a permis de séparer un certain nombre de constituants dont l'acide Tannique dans l'E-BuOH, l'Hydroquinone dans l'E-Acé , la vanilline et

l'Hydroquinone dans l'E-T. Par ailleurs, L'analyse qualitative des extrait flavoniques et tannique par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) nous a permis de constater que l'E-BuOH et L'E-T semble contenir la catéchine et la rutine, nous avons pu identifier la présence de la rutine et l'absence de la catéchine chez l'E-AC. Par contre la rutine et la catéchine ont été absentes dans l'E-ET de *globularia alypum L.*

Le dosage des phénols totaux des quatre extraits flavoniques et Tannique a révélé des teneurs considérables dans l'E-Ac ($12,49 \pm 0,14$ mg EAG/g d'extrait) et l'E-BuOH ($0,694 \pm 0,023$ mg EAG/g d'extrait). Alors que, les fortes teneurs ont été enregistrées dans l'E-T ($34,68 \pm 0,29$ mg EAG/g d'extrait) et l'E-ET ($28,86 \pm 1,62$ mg EAG/g d'extrait).

D'autre part, le dosage des flavonoïdes a montré que les extraits flavoniques (fraction éther d'éthylique, acétate d'éthyle et 1-butanol) présentent des teneurs modérées : E-ET ($873,65 \pm 5,54$ µg EQ/g d'extrait), E-Ac ($284,60 \pm 1,82$ µg EQ/g d'extrait), E-BuOH ($8246,56 \pm 0,31$ EQ/g d'extrait) respectivement. Ainsi que le dosage des Tanins dans l'extrait Tanniques a révélé une teneur de ($16,48 \pm 6,36$ mg EC/g d'extrait).

L'étude du pouvoir antioxydant de nos extraits par la méthode de piégeage du radical libre DPPH s'est montré modérée dont les valeurs de IC50 sont classées dans l'ordre du pouvoir antioxydant suivant : extrait tannique (0.515) > fraction d'acétate d'éthyle (0.57) > fraction n-butanol (1.11) > fraction d'éther di-éthylique (10.92). Concernant l'huile essentielle, on a déduit qu'elle possède des capacités de piégeage du radicale libre DPPH très faible.

La comparaison de ces valeurs avec celle de l'antioxydant standard, l'acide ascorbique (0.46), nous a permis de déduire que le pouvoir antioxydant de l'ensemble des extraits testés est plus faible que celui de l'acide ascorbique.

Par ailleurs, l'étude du pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion de disque des extraits flavoniques et Tannique révèle que l'E-ET présente l'action inhibitrice la plus intéressante dont il est considéré comme modérément inhibiteur vis-à-vis les souches testées. Tandis que les autres extraits sont faiblement actifs sur les souches bactériennes testées. En ce qui concerne l'étude du pouvoir antifongique vis-à-vis de *condida albicans* à permis de visualiser une seule action inhibitrice de l'E-ET par rapport aux autres extraits.

L'huile essentielle s'est montrée plus sensible vis-à-vis de *S.aureus*, Par contre, les autres bactéries ainsi que la levure ont manifesté une résistance vis-à-vis de cette dernière.

Par ailleurs, l'étude du pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion de disque des extraits flavoniques et Tannique des vis-à-vis des souches microbiennes a permis de visualiser une action inhibitrice plus intéressante de la fraction d'éther di éthylique par rapport à l'ensemble des extraits testés, alors que, l'huile essentielle s'est montrée plus sensible vis-à-vis de *S.aureus*, Par contre, les autres bactéries ainsi que la levure ont manifesté une résistance vis-à-vis de cette dernière.

L'extrait flavonique de *globularia* inhibé à 6,80% à la dose de 0.1g/ml l'œdème de la patte postérieure de la souris induit par la carragénine, de 27,15% à la dose de 0.2g/ml et de 33,01% à la dose de 0.3g/ml, cette inhibition malgré qu'elle est important, reste moindre que celui de la référence l'acide acétyle salicylique à la dose de 2mg/ml, qui a donné un pourcentage de réduction de l'œdème 39,76%, Ces résultats obtenus sont très encourageants pour l'utilisation de cette fraction pour le traitement des inflammations.

Pour l'activité antalgique de la fraction butanolique de la globulaire a la dose de 0.3mg/ml, donné un pourcentage d'inhibition des torsions provoquées par l'acide acétique de 95,52%, L'effet de Paracétamol à la dose de 2mg/ml, qui a été utilisé comme médicaments de référence, reste moins important que notre fraction butanolique avec un pourcentage de protection de 91.047%. De ce fait, ce produit naturel sera conseillé, comme alternative, pour le traitement des douleurs.

L'analyse des éléments minéraux majeurs de *globularia alypum* par activation neutronique montre que le contenu en potassium et en sodium dans les échantillons sont très élevés (7.24 g/Kg, 353 mg/Kg) respectivement. Suivi des autres éléments Fe (300 µg/g), Zn (12.1 µg/g), Br (6.45 mg/Kg) classés par ordre décroissant. Tandis que l'Arsenic (102.3 ± 9.8 µg/Kg) est l'élément le plus abondant dans *globularia alypum*, Ces résultats ont montré que cette est une bonne source de K et Ca.

Ces résultats confirment la validité de l'indication traditionnelle de cette plante, et ouvrent la voie à l'exploitation de ces propriétés anti-inflammatoire et antalgique de sons extrait flavonique comme alternative aux traitements chimiques (médicaments).

Par le biais de ce travail, nous espérons avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de la médecine traditionnelle pour parvenir à mettre à la disposition de la population des médicaments à base de plantes médicinales efficaces et accessibles.

❖ **Ainsi de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :**

L'analyse des différents extraits flavoniques et Tannique par la méthode de chromatographie sur couche mince, nous conduira dans la perspective future de notre étude, de compléter et d'approfondir ce travail par une étude phytochimique avancée.

- ✓ Dans un premier temps de faire un fractionnement de ces extraits et d'identifier les molécules responsables des activités biologiques en utilisant des techniques d'identification plus performantes. Ainsi qu'un travail complémentaire s'impose en vue d'identifier les différentes molécules en particulier les composés phénoliques présents dans les extraits isolées des fractions éther di éthylique, acétate d'éthyle et n-butanol et les purifier en utilisant diverses techniques chromatographiques notamment la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et des méthodes spectrales pour l'élucidation structurale.
- ✓ Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'évaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes et de faire des tests in vivo afin de déterminer de nouveaux agents thérapeutiques.

Références

Références

- [1] j.KaberaNzeyumwami, caractérisation des huiles essentielles de trois plantes aromatiques : Hyptisspicigera,plucheaovalis et laggeraaurita , mémoire en biologie et médecine, université de lomp-togo-DEA ,(2004).
- [2]A .Beloued, plantes médicinales d'Algérie , office des publications universitaires, 5^{ème} édition, 2009.3P.
- [3]P.Goetz, Zoom arrière grâce à la paléo ethnobotanique , Phytothérapie,7,295–296, 2009.
- [4]j.bruneton, pharmacognosie phytochimie plantes médicinales , TEC & DOC, 3^{ème} édition, 1999.
- [5]W.Bouزيد, M.Yahi., M.Abeddaim, M.C.Aberkane, A.Ayachi, evaluation de l'activite antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubepine monogyne , Lebanese Science Journal, 12. N° 1, 2011.
- [6]T.Bahorun,Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle, Food and Agricultural Research Council, 1997.
- [7]R.Tsao, Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols,Nutrients, 2 ,1231-1246,2010.
- [8]A.Chabli, S.samane, P.S.Haddad, Etude ethnopharmacologique des huiles essentielles au Canada : détermination et indications des huiles essentielles les plus recommandées , Biologie & Santé, 2. N°1, 2002.
- [9]A.Boutiti, *Etude* phytochimique de l'espèce Globulariaalypum L ,Thèse de magister de l'université de Mentouri de Constantine.
- [10]D .Khlifi, M.Hamdi, A .ElHayouni, S .Cazaux, J.P .Sauchard,F .Couderc, J .Bouajila, Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts of Globulariaalypum L.(Globulariaceae)Leaves,molecules,16,10592-10603,2011.
- [11]R .Tundis, L.Peruzzi, C .Colica, F .menichini, Iridoid and bisiridoid glycosides from Globulariameridionalis (Podp.) O. Schwarz aerial and underground parts, Biochemical Systematic and Ecology, 40,71-74, 2012.
- [12]B .Fehri, J.M .Aiache, KK.M.Ahmed, Active spermatogenesis induced by a reiterated administration of Globulariaalypum L. aqueous leaf extract,phamacognosyresearch,4(3), 138–147,2012.
- [13]A.D.Lucienne,les plantes médicinales d'Algérie, Berti édition, 2^{ème} édition, 2010.138 P.
- [14]Globulariaceae-Globulariaalypum L alypu http://kanlaipoulorondaidan.fr/flore_bonnier/pages/264-globularia_alypum.htm.

- [15] M. Bnouham, H. Mekhfi, A. Legssyer, A. Ziyat, Ethnopharmacology Forum Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco, *Int J Diabetes & Metabolism*, 10, 33-50, 2002.
- [16] F. Bouabdelli, A. Djelloul, O. Z. Kaid, A. Semmoud, A. Addou, Antimicrobial Activity of 22 Plants Used in Urolithiasis Medicine in Western Algeria, *Tropical Disease*, 530-535, 2012.
- [17] M. Dupérat, *arbres et arbustes*, édition Artémis, 2007. 168P.
- [18] C. Boucher, *guides et des arbustes de méditerranée*, 60 arbres et 190 arbustes décrits et illustrés, Delachaux et Niestlé, 2011. 270 P.
- [19] M. R. Gonzalez-Tejero, M. Casares-Porcel, C. P. Sanchez-Rojas, J. M. Ramiro-Gutiérrez, J. Molero-Mesa, A. Pieroni, M. E. Giusti, E. Censori, C. Pasquale, A. Della, D. Paraskeva-Hadjichambi, A. Hadjichambis, H. Houmani, M. El-Demerdash, M. ElZayat, M. Hmamouchi, S. ElJohrig, Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia, *ethno-Pharmacology*, 116, 341-351, 2008.
- [20] R. Ben Mansour, B. Garirgou, B. Garirgou, N. Elloumi, I. Ben Hadj Zilan, Z. Gharabi Gammar, S. Lassoued, Investigation of antioxidant activity of alcoholic extract of *Globularia alypum* L, *Medicinal Plants Research*, 6(25), 4193-4199, 2012.
- [21] A. Chokri, R. Doukali, K. El Abda, R. Ben Chikh, miorelaxant and spasmolytic effects of *globularia alypum* L on rabbit jejunium, *pharmacology*, 6(5), 608-615, 2010.
- [22] P. Bernard, M. M. Lallemand, G. Blansard, Study of the aromatic acids and flavonic compounds, of *Globularia alypum* L. Leaves, *Plant Med Phytother*, 8(3), 174-205, 1974.
- [23] R. K. Chaudhuri, O. Sticher, New Iridoid Glucosides and a Lignan Diglucoside from *Globularia alypum* L. *Helvetica Chimica Acta*, 64, 3-15, 1981.
- [24] B. Ben Hassine, A. Bui, Z. Mighri, A. Cave, Flavonoids and anthocyanins from *Globularia alypum* L, *Plant Med Phytother*, 16 (3), 197-205, 1982.
- [25] P. Stocker, M. Yousfi, O. Djerridane, J. Perrier, R. Amziani, S. El Boustani, A. Moulin, Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase, *Biochimie*, 86, 919-925, 2004.
- [26] M. Djeridane, M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker, N. Vidal, Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, *Food Chemistry*, 97, 654-660, 2006.
- [27] N. E. Es-Safi, A. Kollmann, S. Khelific, P. H. Ducrot, Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure-activity relationship, *food science and technology*, 40, 1246-1252, 2007.
- [28] F. Skim, A. Kaaya, J. T. Jaouhari, H. B. Lazrek, M. Jana, H. El Amri, Hypoglycaemic activity of *Globularia alypum* leaves in rats, *Fitoterapia*, 70, 382-389, 1999.
- [29] D. N. Taleb, D. Krouf, B. Bouchenak, *Globularia alypum* aqueous extract decreases hypertriglyceridemia and ameliorates oxidative status of the muscle, kidney, and heart in rats fed a high-fructose diet, *Nutrition Research*, 31, 488-495, 2011.

- [30]K.Kanoun, Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine) , mémoire de magister de l'université de Tlemcen, 2010.
- [31]A.Gravot, Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux , EquipePédagogique Physiologie Végétale, 2008.
- [32]j.l.Sallé, les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie , éditions Frison-roche, 1991.
- [33]Association française de Normalisation, Huiles essentielles, Tome 2, Monographies relatives aux huiles essentielles. 6ème édition. AFNOR, Paris.2000.
- [34]M.E.Lucchesi, Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles , thèse de doctorat de l'université de la réunion,2005.
- [35]J. Raynaud. Prescription et conseil en Aromathérapie, éditions TEC & DOC. Lavoisier, Paris. 2006.
- [36] M.Valnet, Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International, Food. Microbiology, 85,73-81, 2005.
- [37]M.Lahlou, Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils,Phytotherapy Research, 18, 435-448, 2004.
- [38]J.L.Salle, J .Pelletier, Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie ,Frison-Roche,19-45, 1991.
- [39]A.Lugasi, J.Hovari, K.V.Sagi, L.Biro,The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases,Acta. BiologicaSzegedensis,Volume1(4),119-125, 2003.
- [40]R.Seghiri, Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis* ,Thèse de Doctorat de l'université de mentouri de Constantine.
- [41]K.Ghedira,Les flavonoides. Structure, propriétés biologiques, rôle thérapeutique et emplois en thérapeutique , Phytothérapie, 3(4), 162-169, 2005.
- [42]K.Morreel, G.Goeminne, V.Storme, L.Sterck, J.Ralph, W.Coppieters, P.Breyne, M .Steenackers, M.Georges, E.Messens, W.Boerjan, Geneticalmetabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study,the Plant J ,47,224-37,2006.
- [43]E.Ono, M.Hatayama, Y.Isono, T.Sato, R .Watanabe, K.Yonekura-Sakakibara, M.Fukuchi-Mizutani, Y.Tanaka, T.Kusumi, T.Nishino, T.Nakayama,Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles,ThePlant J, 45,133-43, 2006.
- [44]N.Zeghad , Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne , Mémoire de Magister de l'université de Mentouri de Constantine, 2009.

- [45] J.C. Stoclet, V. Schini-Kerth, Dietary flavonoids and human health, *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 69, 78-90, 2011.
- [46] L.H. Yao, Y.M. Jiang, J. Shi, F.A. Tomas-Barbera, N. Dattan, R. Singanusong, S.S. Chen, Flavonoids in Food and Their Health Benefits, *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 113-122, 2004.
- [47] A. Arora, G.N. Muraleedharan, M. Gale Strasbourg, Structure-Activity Relationships pour les activités antioxydantes des flavonoïdes une série de liposomale dans un système, *médecine*, 24, 1355-1363, 1998.
- [48] S. AKROUM, *Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels*, thèse de doctorat de l'université de Mentouri de Constantine, 2010.
- [49] E. J. Middleton, G. Drzewiecki, Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agent, *Biochemical pharmacology*, 33, 3333-3338, 1984.
- [50] A.T. Mbaveng, B. Ngameni, V. Kuete, S.I. Konga, P. Ambassa, R. Roy, M. Bezabih, F. Xavier Etoa, N.B. Tchaleu, M. A. Berhanu, J.J. Marion Meyer, N. Lall, B.P. Penlap, Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia* (Moraceae), *Ethnopharmacology*, 116, 483-489, 2008.
- [51] L. Chebil, *Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle*, Thèse de doctorat de l'institut National polytechnique de Lorraine. France, 2006.
- [52] K. Khababae, T. Van Ree, Tannins: Classification and Definition, *Nat. Prod. Rep.*, 18, 641-649, 2001.
- [53] H.P.S. Makkar, Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds, *Small Ruminant Research*, 49, 241-256, 2003.
- [54] J. L. Mangan, Nutritional effects of tannins in animal feeds, *Nutr. Res. Rev.*, 1, 209-231, 1988.
- [55] C.S. McSweeney, B. Palmer, D.M. McNeill, D.O. Krause, Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants, *Animal Feed Science and Technology*, 91, 83-93, 2001.

- [56] J.J. Macheix, A. Fleuriet, C. Jay-Allemand, les composés phénoliques des végétaux, presses polytechniques et universitaires romandes, 2005.
- [57] N. Zimmer, R. Cordesse, Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants, INRA Productions Animales, 9, 167-179, 1996.
- [58] W. Feucht, D. Treutter, E. Christ, Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black forest, Tree Physiology, 17, 335-340, 1997.
- [59] A. Hässig, Schwabl, K. Stampfli, Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character, Medical Hypotheses, 52, 479-481, 1999.
- [60] Y.Y. Lim, T.T. Lim, J.J. Tee, Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study, Food Chemistry, 103, 1003-1008, 2007.
- [61] K.T. Chung, C.I. Wei, M.G. Johnson, Are tannins a double-edged sword in biology and health, Trends in Food Science and Technology, 9, 168-175, 1998.
- [62] Y.D. Jung, L.M. Ellis, Inhibition of tumour evasion and angiogenesis by epigallocatechingallate (EGCG), a major component of green tea, International Journal of Experimental Pathology, 82, 309-316, 2001.
- [63] T. Hatano, M. Kusuda, K. Inada, T. Ogawa, S. Shiota, T. Tsuchiya, T. Yoshida, Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Phytochemistry, 66, 2047-2055, 2005.
- [64] Song J.H., Kim S.-K., Chang K.-W., Han S.K., Yi H.K., Jeon J.G., 2006, In vitro inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, Archives of Oral Biology, Volume 51: 1131-1140, (2006).
- [65] K. Yamaguchi, M. Honda, H. Ikigai, Y. Hara, T. Shimamura, Inhibitory effects of (-)-epigallocatechingallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), Antiviral Research, 53, 19-34, 2002.
- [66] J.M. Song, K.H. Lee, B.L. Seong, Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus, Antiviral Research, 68, 66-74, 2005.
- [67] Z. Mohammedi, étude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavanoides de quelques plantes de la région de Tlemcen, mémoire de magister de l'université de Tlemcen, 2006.
- [68] Y. Morel, R. Barouki, Repression of gene expression by oxidative stress, Biochemical Society, 342, 481-496, 1999.
- [69] N. Bougandoura, Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha spnepta* (nabta) et *Ajuga reptans* (chendgoura) de l'ouest d'Algérie, mémoire de magister de l'université de Tlemcen, 2011.

- [70] N. Guggenbühl, les antioxydants à la source, *bull soc belge ophtalmol*, 301, 41-45, 2006.
- [71] B. Nickavar, F. Al-Sadat Abolhasani, screening of antioxidant properties of seven umbelliferae fruits from iran, *pak. j. pharm*, 22(1), 130-135, 2009.
- [72] A. Mika, F. Minibayeva, R. Beckett, S. Lüthje, Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species, *Phytochemistry Reviews*, 3, 173-193, 2004.
- [73] G. Yakhlef, étude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *thymus vulgaris* L. et *laurusnobilis*, mémoire de magistère de l'université de Batna, 2010.
- [74] B. S. Amadou, étude de la phytochimie et des activités biologiques de *comberetum glutinosum* ex *combretaceae*, thèse de doctorat de l'université de Bamako Mali, 2005.
- [75] F. Z. Lahlah, extraction des flavonoïdes par le butanol et le chloroforme à partir de *silybum marianum* et étude de leur activité antimicrobienne, mémoire de magistère de l'université de Mentouri de Constantine, 2008.
- [76] M. Ndiaye, Y. Syg, A. M. Dièye, M. T. Touré, B. Faye, évaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*annonac reticulata* (annonacaceae) sur l'œdème aiguë de la patte de rat induit par la carragénine, *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 14, 179-186, 2006.
- [77] B. Harald, B. Collett, V. Ventafridda, R. Cohen, D. Gallacher, survey of chronic pain in Europe : prevalence, impact on daily life, and treatment, *European journal of pain*, 10, 287-333, 2006.
- [78] B. Mamadou, étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *nauclea latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat de l'université Blaise Pascal Mali, 2011.
- [79] E. Beneteaud, les techniques d'extractions, comité français du parfum, 2011.
- [80] E. Trease, W. C. Evans, *Pharmacognosie*, Billiaire Tindall, édition 13^e, 1987, 61-62 P.
- [81] S. A. Treki, R. Merghem, L. Dehimat, étude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée : *thymus hirtus*, *Sciences & Technologie*, 25-29, 2009.
- [82] S. Y. Zhang, C. G. Zheng, X. Y. Yan, W. X. Tian, Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371, 654-658, 2008.
- [83] E. Antonot, R. Marchal, *Chromatographie*, Stage MAPEN, 1998, 5 P.
- [84] Z. Males, M. Medic-Saric, Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens*, *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 253-359, 2001.
- [85] H. Dejian, O. U. Boxin, L. P. Ronald, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *Agric. Food Chem*, 53, 1841-1856, 2005.

- [86]C .Yong Lee, O.K .Chun, D.O.Kim, N .Smith, D .Schroeder, J.Ta .Han ,Daily consumption of phenolics and totalantioxidant capacity from fruit and vegetablesin the American diet, *Science of Food and Agriculture*, 85,1715–1724,2005.
- [87]T .Bahorun, B .Gressier, F .Trotin, C.Brunete, T .Dine, J.Vasseur, J.C.Gazin, M .Pinkas, M .Luycky, M.Gazin, Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts fromhawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations,*Arzneimittel-Forsch*, 46,1086-1089,1996.
- [88]M.L .Price, S .Vanscoyoc, L.G .Butler,A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain, *Agric. Food Chem*, 26, 1214-1218,1978.
- [89]A .Mansouri, G .Embarek, E .Kokkalou, P .Kefalas, Phenolic profile andantioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*) , *FoodChemistry*, 89, 411-420, 2005.
- [90]pharmacopée européenne, édition Sixie me ,2008.
- [91]M.COLOT, *Notions techniques de pharmacologie générale* , édition Masson, 1972,137 P.
- [92]H.G .Vogel, W.H.Vogel, *Drug discovery and evaluation*. In: *Pharmacological Assays*, Springer-Verlag, Berlin, 80–168, 1997.
- [93] M.E.A.BENAMAR, *techniques nucléaires de microanalyses, baie d’Alger entre pollution et enjeux sanitaire*, office des publications universitaires, édition N°5349, 2012, 45 P.
- [94] I .Booij, G .Pionbo, J. M .Risterucci, M .Coupe , D .Thomas, M .Ferry , *Etude de la composition chimique de dates à différents stades de maturité pour la caractérisation variétale de divers cultivar de palmier dattier (Phoenix dactylifera L.)* ,*Fruits*, 47. N° 6, 667-677, 1992.
- [95]H.H.Lee, L.L .Yang, C.C .Wang, S.c .Hu, S.F .Changd, Y.H Lee, *Differential effects of natural polyphenols on neuronal survival inprimary cultured central neurons against glutamate- and glucosedepprivation-induced neuronal death*,*Brain Research*, 986 ,103–113, 2003.
- [96]K.R.Markham, *Techniques of flavonoid identification*,Academic Press. London, 1982, 133P.
- [97]A.Meziti ,*Activité antioxydante des extraits des graines de nigella sativa L.étude in vitro et in vivo*,mémoire de magister de l’université d’él-hadj lakhdar de Batna,2009.
- [98]S.Athamena, I .Chalghem, A .Kassah-Laouar, Laroui.S, S .Khebri, *activite anti-oxydante et antimicrobienne d’extraits de cuminumcyminum l* ,*Lebanese Science Journal*, 11. N°1, 2010).
- [99]A.Telli, N .Mahboub, S.Boudjeneh, O.E.K.Siboukeur, F.Moulti-Mati ,*optimisation des conditions d’extraction despolyphenols de dattes lyophilisees (phoenixdactyliferal)variete ghars*,*Annales des Sciences et Technologie*, 2. N° 2, 2010.
- [100]Bouterfas.K,Mehdadi.Z,Latreche.A, Zouaoui.H ,Bouredja.N, « *quantification de quelques polyphénols de marrubium vulgare l. du mont de tessala (algérie occidentale) pendant les deux périodes de végétation et de floraison* *quantification of some polyphenols of*

marrubium vulgare l. of tessala mount (western algeria) at the vegetative and the flowering periods », les technologies de laboratoire, Volume 8, N°31, (2013).

[101] W. Bouzid, Etude de l'Activité Biologique des Extraits du Fruit de *Crataegus monogyna* Jacq, Mémoire de magistère de l'université -el hadj lakhder –Batna, 2009.

[102] D. Amič, D. Davidovic-Amic, D. Beslo, N. Trinajstić, Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76, 55-61, 2003.

[103] A.A. Adedapo, M.O. Sofidiya, V. Maphosa, B. Moyo, P.J. Masika, A.J. Afolayan, Anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous extract of *Cussonia paniculata* stem Bark, *Rec. Nat. Prod.*, 2, 46-53, 2008.

[104] H.P. Kim, K.H. Son, H.W. Chang, S.S. Kang, Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms, *Pharmacol Sci*, 96(3), 229-45, 2004.

[105] R.J. Nijveldt, E. Van Nood, D.E. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren, P.A. van Leeuwen, Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Clin Nutr*, 74, 418-25, 2001.

[106] R. Tabaraki, Z. Yosefi, H.A.S. Gharnieh, Chemical Composition and Antioxidant Properties of *Malva sylvestris* L, *Research in Agricultural Science*, 8.N°1, 59 – 68, 2012.

ANNEXES

Annexe 1

Matériels non biologique

1. Equipements.

Balance de précision
Plaque chauffante
Bain marie
Bec de benzène
Etuves bactériologiques
Pince
Spatule
Cages
Des seringues graduées à aiguilles
La canule gastrique
Les gants

3. Milieux de culture

Gélose Sabouraud
Gélose Muller –Hinton

2. Verreries et consommables.

Ballon à fond rond à col rodé : 50 ml, 250 ml, 500 ml
Ballon tri colles 2000ml
Ampoule a décanté 50 ml, 250 ml
Réfrigérant
Béchers: 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml
Pipettes Pasteurs
Eprouvette
Tubes à essai stériles
Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
Discs 9mm de diamètre

4. Solutions et réactifs utilisés

Trichlorure d'aluminium
Acide acétique -Carbonate de sodium
Acide chlorhydrique (HCl) : 35.5° ,37°
Eau de javel -DPPH
Eau distillée-Acide Tannique
Ethanol ,99.5°- Acide salicylique
Méthanol 85° ,99.5°- Acide caféique
Acétone 9978- catéchine -- Vanilline
Éther d'éthylique- rutine – coumarine

Acétate d'éthyle96°- Chlorure de fer

Dichlorométhane96°
1-butanol - Acide benzoïque

Annexe 2

1. Préparation des solutions de référence (l'acide acétylsalicylique et Paracétamol) :

Dans un erlemmeyer de 250 ml on dissout dans l'eau distillée un comprimé de :

- Acepral 500mg, pour la solution de acétylsalicylique (pour l'activité anti-inflammatoire).
- Paralgan 500mg, pour la solution de Paracétamol (pour l'activité antalgique).

On agitant le mélange jusqu'à la dissolution complète du comprimé.

2. Préparation des dilutions de la fraction butanolique :

Dans une fiole de 10 ml on ajoute :

- 0.1 g de la fraction butanolique pour une dose de 1% (0.1g/ml).
- 0.2g de la fraction butanolique pour une dose de 2% (0.2g/ml).
- 0.3g de la fraction butanolique pour une dose de 3% (0.3g/ml).

Annexe 3

Tableau. V. 1 : Le rendement en huile essentielle de globularia alypum en fonction du temps

Temps (min)	Rendement (%)
0	0
120	0.00073
150	0.0011
180	0.0019
300	0.00251
390	0.00256

Tableau .V.2: résultats de la droite d'étalonnage de l'acide gallique

Concentration (mg/ml)	DO
0.25	0.842
0.20	0.716
0.15	0.539
0.10	0.380
0.05	0.189

Tableau. V.3 : résultats de la droite d'étalonnage de la quercétine

Concentration (mg/ml)	DO
0,005	0,187
0,010	0,592
0,015	1,03
0,020	1,468
0,025	1,872

Figure. V. 4 : pourcentage d'inhibition de DPPH par les différentes fractions flavoniques en fonction de concentration

C (mg/ L)	40	32	24	16	8	4	2	0
Vit C	97,33	96,72	93,32	95,2	94,5	86,4	52,4	0
E-ET	85,43	81,86	76,92	83,79	36,26	2,74	0,5	0
E-AC	85,98	85,43	82,72	84,89	81,6	80,76	48,21	0
E-BuOH	87,08	85,16	86,26	86,53	84,89	64,34	49,8	0

Figure. V.5 : pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait Tannique en fonction de concentration

C (mg/L)	40	32	24	16	8	4	2
Vit C	97,33	96,72	93,32	95,2	94,5	86,4	50
E-T	90,65	90,38	89,56	89,83	87,63	86,26	47,96

Figure. V.6 : pourcentage d'inhibition de DPPH par l'huile essentielle en fonction de concentration

C (mg/L)	5	3	1,5	1	0,5	0
HE	37,44	28,92	19,73	18,38	12,78	0

Annexe 4

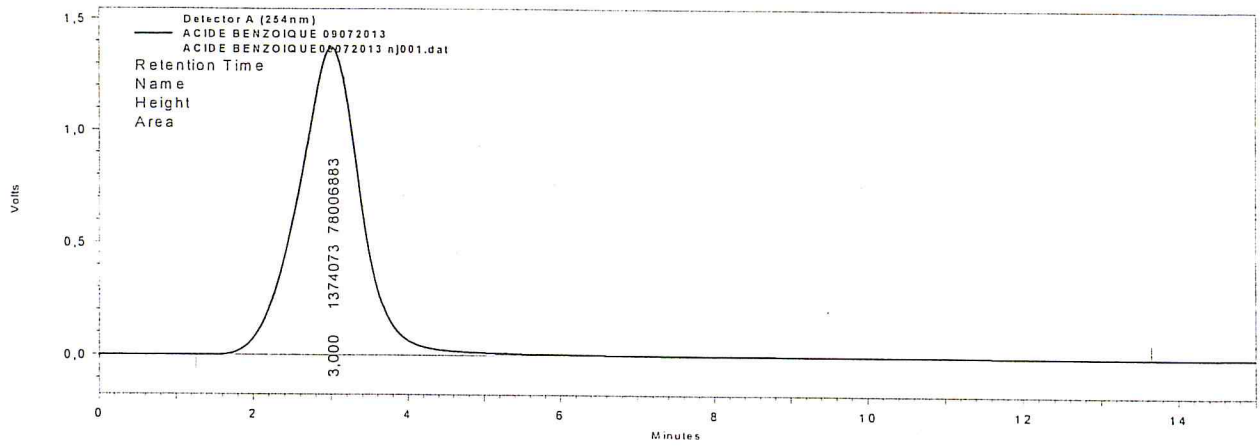


Figure. V.7 : Chromatogramme de l'acide benzoïque utilisé dans l'HPLC.

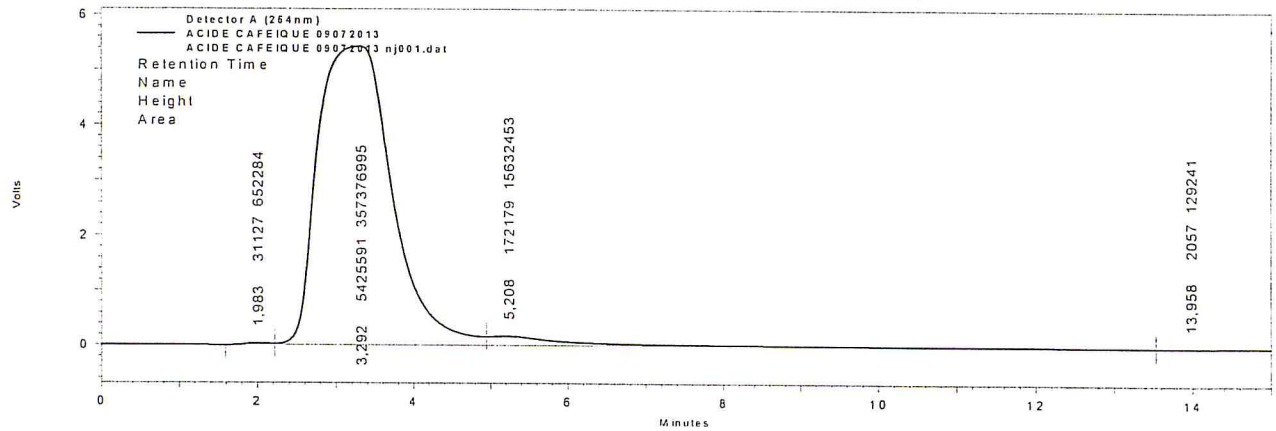


Figure. V.8 : Chromatogramme de l'acide caféique utilisés dans l'HPLC.

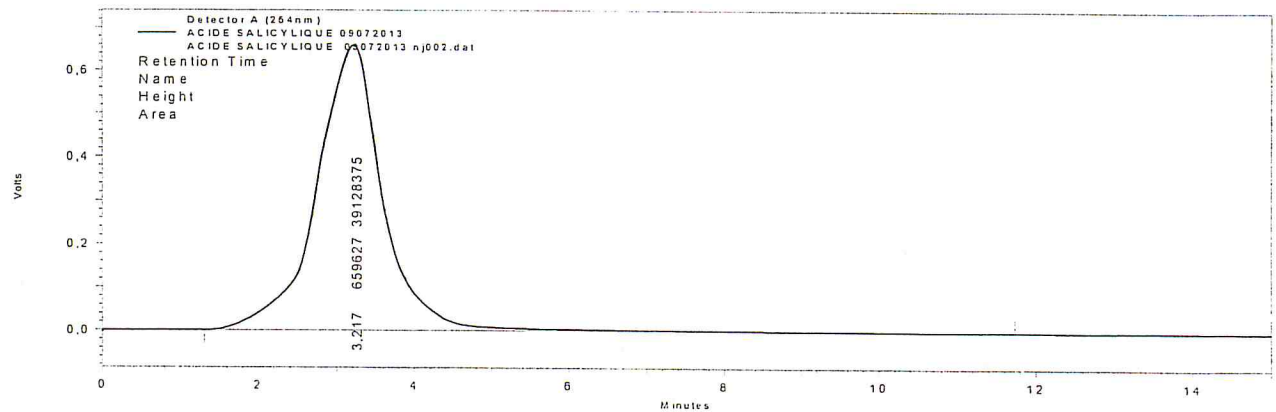


Figure. V.9 : Chromatogramme de l'acide salicylique utilisé dans l'HPLC.

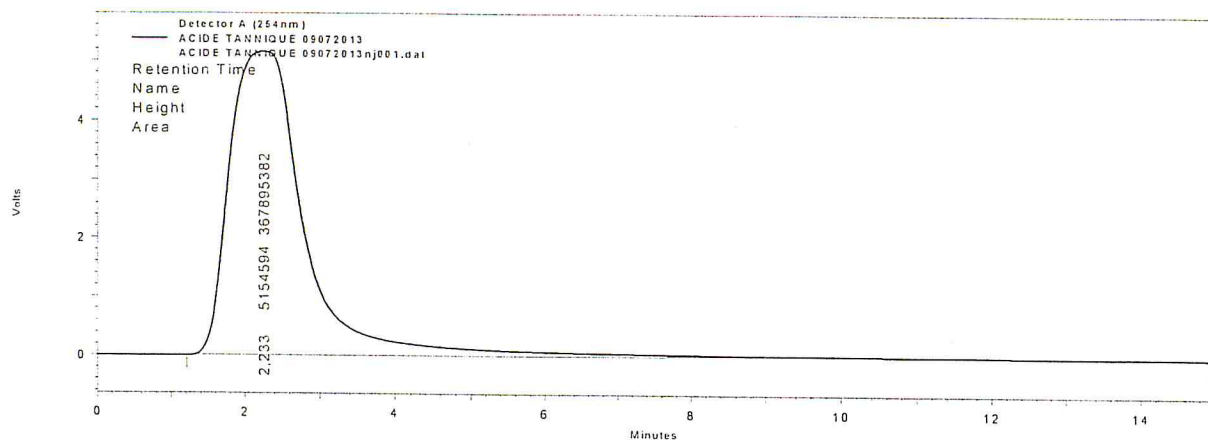


Figure. V.10 : Chromatogramme de l'acide Tannique utilisé dans l'HPLC.

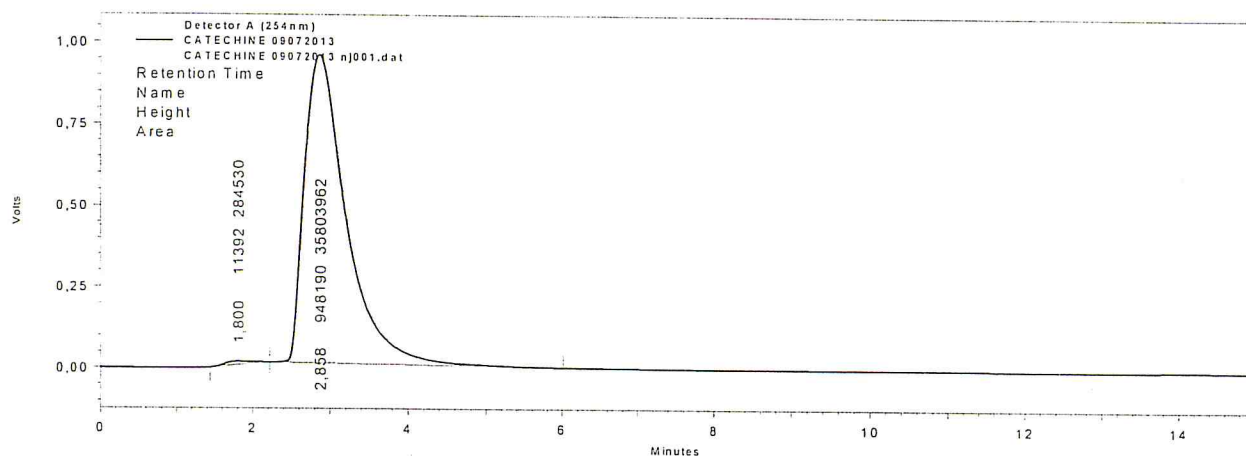


Figure. V.11 : Chromatogramme de la catéchineutilisés dans l'HPLC.

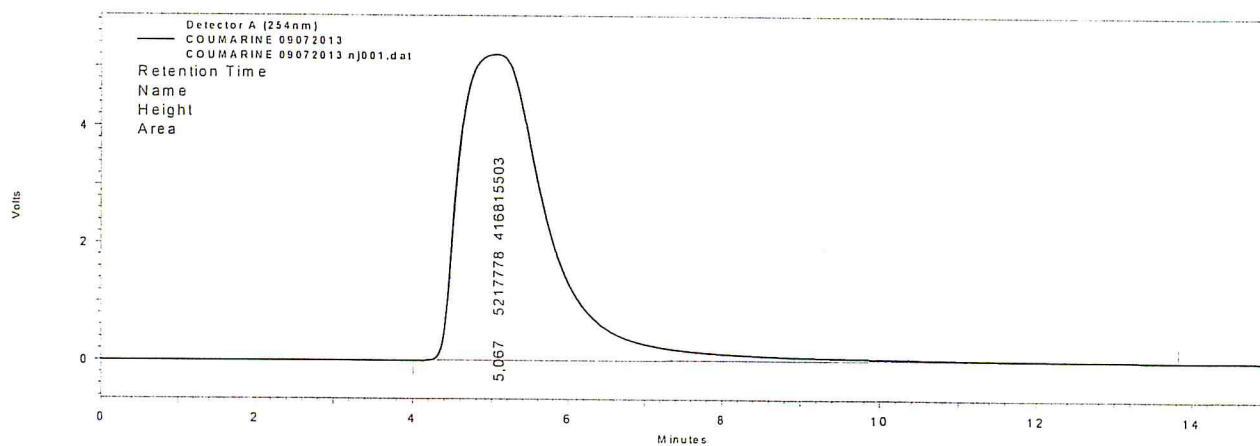


Figure. V.12 : Chromatogramme de la coumarine utilisée dans l'HPLC.

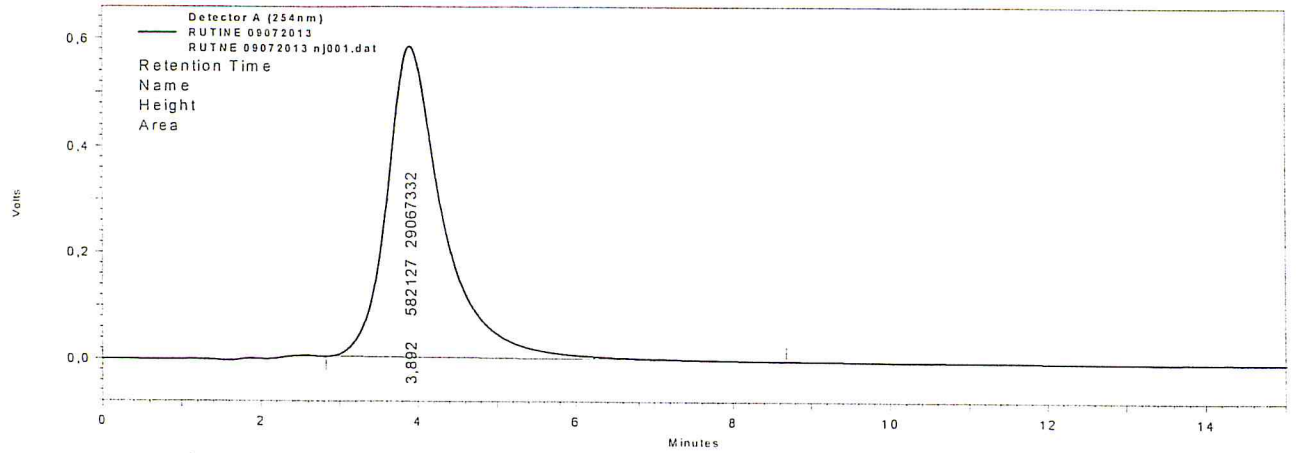


Figure. V.13 : Chromatogramme de la Rutineutilisés dans l'HPLC.

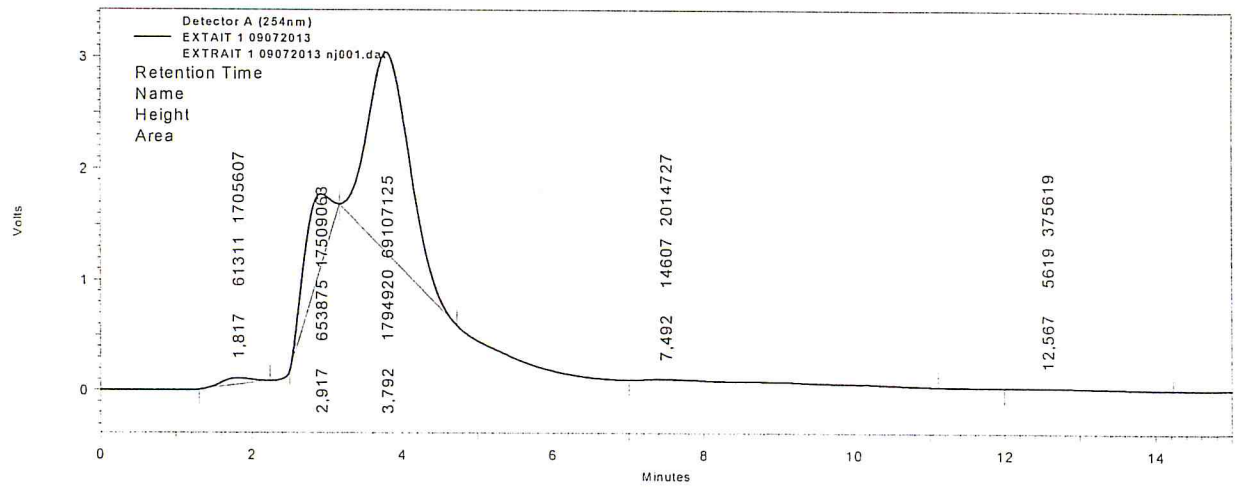


Figure. V.14 : Profil chromatographique de l'E-BuOHutilisés dans l'HPLC.

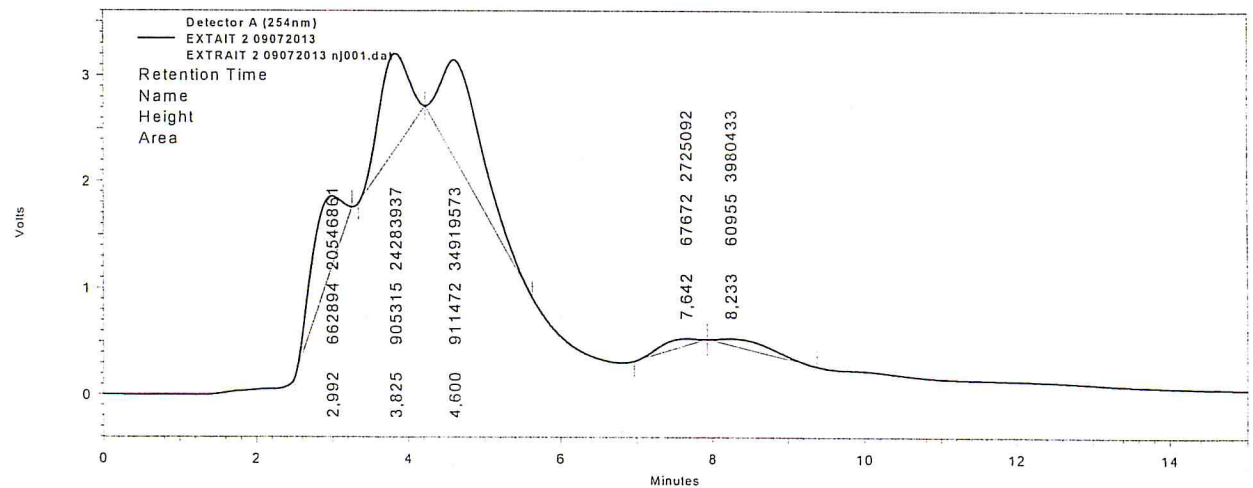


Figure. V.15 : Profil chromatographique de l'E-Acutilisés dans l'HPLC.

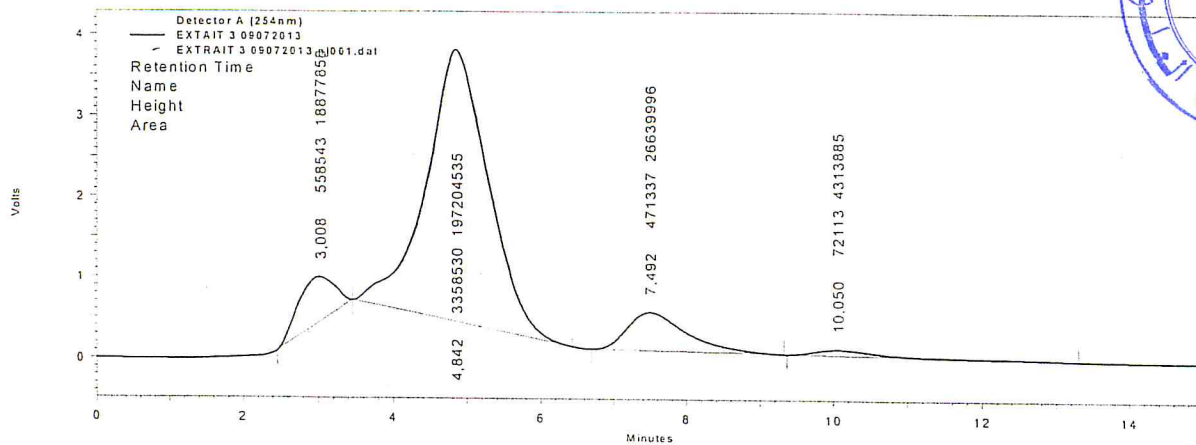
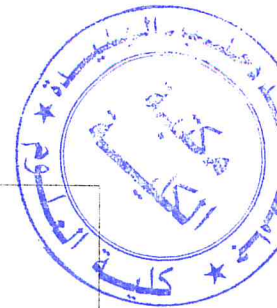


Figure. V.16 : Profil chromatographique de l'E-ETutilisés dans l'HPLC.

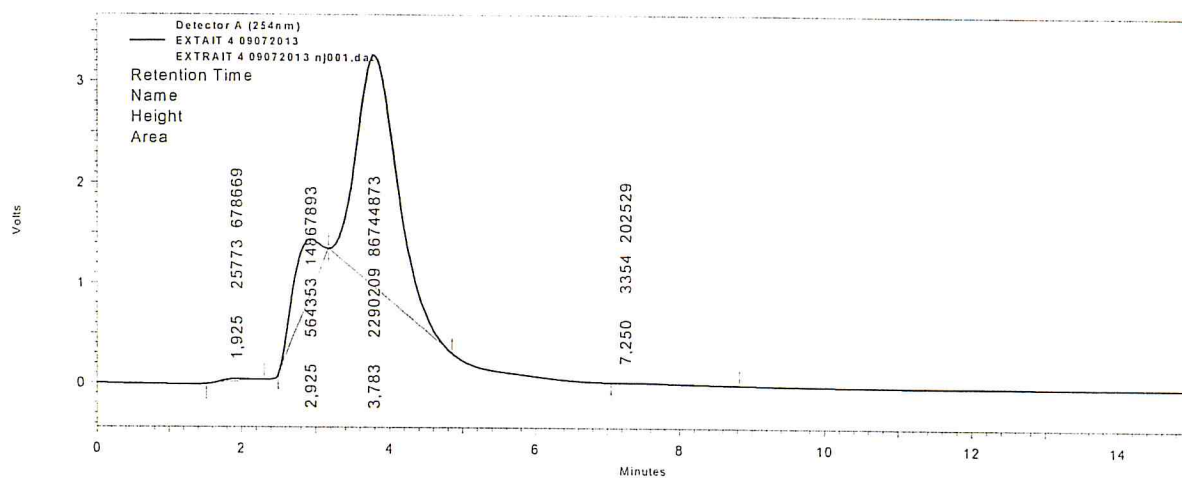


Figure. V.17 : Profil chromatographique de l'E-Tutilisés dans l'HPLC.