

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie des Populations et des Organismes



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de master en Biologie
Option: Phytothérapie et Santé

Thème

Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de quelques activités biologiques de l'extrait aqueux des feuilles de *Globularia alypum L. (Globulaire)*

Soutenu le : 28/10/2015

À 14h30

Présenté par :

❖ **M**^{elle} **MEBARKI SORAYA.**

Devant le jury :

M^r Bessad.A

MCB

UB-1

President

M^{me} Belhis .I

MAB

UB-1

Examinatrice

M^{me} Chérif, H.S

Maître de conférences (B)

UB-1

Promotrice

Promotion: 2014–2015



Remerciements

Avant tout, je remercie **Dieu**, notre Créateur pour m'avoir donné le courage et la patience afin de mener à terme le présent travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à ma promotrice **Mme Chérif, H.S**, pour m'avoir guidée durant cette année.

Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

J'adresse mes profonds remerciements à ma Co-promotrice **M^r Boukhatem** (SAIDAL Médéa) pour son aide, ses encouragements et ses conseils tout au long de ce travail et aussi **M^r Benzina**, pour son soutien en matériels et de m'avoir aidé durant ma période de stage pratique et ainsi que Madame **Imen** et **Abdel rezaq**.

Je tiens également à remercier Madame **Bakhti** et Madame **kaskas** de m'avoir ouvert les portes de leurs laboratoires, sans oublier l'ensemble du personnel des laboratoires physico-chimique et toxicologie de SAIDAL de Médéa.

Au membre de jury :

Le Président Mr **Bessad. A** pour avoir aimablement accepté de présider le jury.

L'examinatrice Madame **Belhis .I** d'avoir accepté d'examiner mon travail.

A l'ensemble des personnels des laboratoires d'hygiène de Faroudja de Blida sans oublier **Ammi djamel** et **Madame Selma et Rachida**.

Enfin, ma reconnaissance va à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Une pensée pour tous mes amis qui m'ont soutenu au cours de cette année.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail, à mes très chers parents.

A mes sœurs **Amina, fadwa**, mes frères **Djamel Eddine** et **Salim**

A mes oncles **Sid Ahmed** et surtout **khalo Djamel**

A mes tantes, **Nassima, Lamia**, leurs maris **Mahmoud** et **Mustafa**.

A mes cousines **Yousra, Racha, Amelia, Salma** et mon cousin **Walid**.

A mes tantes, **Lila, Salima, Djamila, Zahia, Naima** leurs maris **Mohamed** et **Tayeb**.

A mes oncles **Nacer dine, Nacer, kader, Hacem** et **abdel rezak**

A mes cousines **Nihel, Wiame, Milisa, Hanane, Manal** et **Aya** et mes cousins **Cherif, Mohamd, Hossem, Morad, Djalil, Walid, et Hamza**.

A mes très chères amies **Zohra** et **Meriem**.

A toute personne qui me connait.

Liste des abréviations

Ac : Acide.

ATCC: Américain Type Culture Collection.

CRD: Centre de Recherche et de Développement.

EAG : équivalent acide gallique.

EQ : équivalent quercétine.

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance.

MDC : Médicament.

Mg : Magnésium.

MH: Milieu de culture Mueller –Hinton.

O.N.A.B : Office National d’Alimentation des Bétails.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

PD: Patte Droite.

PG: Patte Gauche.

R% : Rendement de tanins.

SAB: Milieu de culture Sabouraud.

TR : Temps de Rétention.

Liste des figures

Figure 01: Aspect de <i>Globularia alypum L</i>	12
Figure 02 : Les souris utilisées.....	17
Figure 03 : Préparation d'un extrait aqueux.....	20
Figure 05: schéma démonstratif de la lecture de diamètre des zones d'inhibitions des souches bactériennes	26
Figure 06 : Photo de Gavage des souris.....	27
Figure 07: Injection de la carraghénine sous l'aponévrose plantaire de patte arrière gauche de la souris.....	28
Figure 08: Injection de l'acide acétique aux souris.....	30
Figure 09 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de <i>Globularia alypum L</i> après révélation chimique par $H_2 SO_4$	34
Figure 10 : Diamètre des zones d'inhibition des souches microbiennes par extraits aqueux de <i>Globularia alypum L</i>	37
Figure 11 : Evaluation des poids moyens des pattes droites et pattes gauches des souris des trois lots.....	38
Figure 12: Le pourcentage d'augmentation de l'œdème des pattes gauches par rapport aux pattes droites des trois lots.....	39
Figure 13: le pourcentage de réduction de l'œdème de lot de référence et lot essai par rapport au lot témoin.....	40
Figure 14: Courbe d'étalonnage.....	43
Figure 15 : Les IC50 de l'extrait aqueux de <i>Globularia alypum L</i> et de l'acide ascorbique.....	44

Liste des tableaux

Tableau I: Caractéristiques des souches microbiennes utilisées.....	18
Tableau II : Résultats du screening chimique.....	33
Tableau III : Valeurs des rapports frontaux.....	35
Tableau IV : Rapport frontaux des l'extraits utilisés	35
Tableau V : Diamètre des zones d'inhibition des souches bactériennes.....	36
Tableau VI: Evolution des poids moyens des pattes des lots.....	36
Tableau VII : Nombre de crampes/souris observé pendant 10 min et le pourcentage de réduction de crampes.....	42
Tableau VII : valeur des IC50 établies pour chaque extrait ainsi que celle de l'acide ascorbique.....	44

Sommaire

Introduction.....1

Etude Bibliographique

Chapitre I : Les plantes médicinales

I. 1- Historique sur les plantes médicinales.....3

I. 2-Définition des plantes médicinales et de la phytothérapie3

I. 3-Place de la phytothérapie en Algérie.....4

Chapitre II : Les Polyphénols

II. 1-Définition des principes actifs.....6

II. 2-Les rôles thérapeutiques des principes actifs8

Chapitre III : Présentation de la plante

III. 1-Description morphologique de la plante *Globularia alypum L*12

III. 2-Noms vernaculaires.....13

III. 3-Systematique13

III. 4- Répartition géographique.....13

III. - Les activités biologiques de *Globularia alypum L*.....14

III. 6- Usages traditionnels et thérapeutiques de la plante.....14

III. 7- Toxicité de la plante.....15

Matériel et Méthodes

I. Matériel :	16
I.1-Matériel végétale.....	16
I.2-Matériel animal et les souches microbiennes.....	17
II. Méthodes :	18
II.1-Test phytochimique préliminaire (Screening chimique).....	18
II.2-Préparation de l'extrait aqueux	20
II.3-Analyse qualitative par CCM.....	20
II.4- Séparation et identification par HPLC.....	22
II.5- Test de l'activité antimicrobienne.....	24
II.6 - Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	26
II. 7- Evaluation de l'activité anti spasmodique.....	29
II.8- Evaluation de l'activité anti oxydante.....	31

Résultats et Discussion

I. Résultats de l'étude phytochimique	33
III. Résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM).....	34
IV. Résultats de l'activité antimicrobienne.....	36
V. Résultats de l'activité anti-inflammatoire.....	38
VI. Résultats de l'activité anti spasmodique.....	41
VII. Résultats de l'activité anti oxydante	43

Conclusion.....	46
------------------------	-----------

Référence Bibliographique

Annexes

Résumé

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à une plante à caractère thérapeutique, très répandue dans le bassin méditerranéen, (*Globularia alypum L*) communément appelée en Algérie Tasselgha.

L'analyse phytochimique réalisée sur la poudre des feuilles de *Globularia alypum L* montre clairement la présence massive des tannins et des flavonoïdes. Les saponosides sont également présentes mais en quantité moindre. Les alcaloïdes sont aussi présents mais sous forme de trace. Quant aux anthocyanes, aux leuco-anthocyanes et aux quinones libres ils n'ont pas pu être identifiés par le test screening chimique.

L'analyse par CCM a permis d'identifier trois composés qui sont l'Acide gallique, l'Acide Tannique, et l'Hydroquinone.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux montre que les feuilles de *Globularia alypum* ont une action car les zones d'inhibitions obtenues sont respectivement de **10mm** et de **13mm** en ce qui concerne les bactéries *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*. La zone d'inhibition du Champignon *Aspergillus* est la plus importante (**22mm**), ceci prouve que la Globulaire a un grand pouvoir antifongique.

On a évalué l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux qui montre un pourcentage d'augmentation de l'œdème pour le lot essai N° 1 (Extrait aqueux à 5%) est de **21,31 %**. Tandis que pour le lot essai N° 2 (extrait aqueux à 10%) il est de **17,85%**.

La plante étudiée possède un pouvoir antioxydant étant donné que l'IC₅₀ de l'extrait aqueux de *Globularia alypum L* est **7.96mg/l**.

Enfin on a constaté selon le test de *Writhing* (Rouibi et al., 2012) que cette plante a un pouvoir antispasmodique vu que les pourcentages de protection des extraits aqueux à 5% et 10% sont respectivement de **35,36%** et de **73,89%**.

Mots clés :

Globularia alypum L, Extrait aqueux, Activité antimicrobienne, Activité anti-inflammatoire, Activité antioxydante, Activité antispasmodique.

Abstract

The phytochemical analysis performed on the powder leaves *Globularia alypum L* clearly shows the massive presence of tannins and flavonoids. The saponins are also present but in smaller quantities. The alkaloids are also present but in trace amounts. As for anthocyanins, the leuco anthocyanins and free quinones they could not be identified by the screening test chemical.

CCM analysis identified three compounds that are gallic acid, Tannic Acid and Hydroquinone.

The evaluation of the anti macrobienne aqueous extract shows activity that leaves *Globularia alypum* have an action because the inhibitions obtained areas are 10mm and 13mm respectively as regards the bacteria *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The zone of inhibition of the fungus *Aspergillus* is the largest (22mm), this proves that the Globular has great anti fungal power.

Was evaluated for anti-inflammatory activity of the aqueous extract which shows a percentage increase in edema test for lot N° 1 (5% aqueous extract) is 21.31%. While for the test batch N° 2 (10% aqueous extract) is de17, 85%.

The plant has studied an anti oxidizing power as the IC50 of the aqueous extract of *Globularia alypum L* is 7.96mg / L.

It has been found according to the test *Writhing (Rouibi et al., 2012)*, this plant has an anti spasmodic power since aqueous extracts of percentages of protection 5% and 10% respectively of 35.36% and 73, 89%.

Key words:

Globularia alypum L, Aqueous extract, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, antioxidant activity, antispasmodic activity.

ملخص

من خلال هذا العمل ; قمنا بدراسة نبات (*Globularia alypum L*) ذو طابع علاجي , وهو نبات من فصيلة متوفرة بكثرة في منطقة الحوض المتوسط , كما يعرف في الجزائر باسم (تاسلغا) .

*تشمل هذه الدراسة تحليلا كيميائيا نباتيا , و اختبارات صيدلانية و مكر وبيولوجية تشمل المستخلص المائي من اوراق هذه النبتة .

-التحليل الكيميائي النباتي بين انه يحتوي على الكثير من المواد الفعالة :تانا(tannins) , فلافونيدات (flavonoïdes) بنسبة كبيرة و الصابونوزدات (saponosides) موجودة أيضا ولكن بكميات أقل .

بالنسبة لدراسة حساسية الكائنات المجهرية بينت ان المستخلص المائي لنبتة *Globularia alypum* يحتوي على قدرة مضادة للبكتيريا بمساحة قدرها 10-13مم بالنسبة ل (*Bacillus subtilis , Pseudomonas aeruginosa*) وهذا المستخلص المائي له قدرة على القضاء على الفطر *Aspergillus* حيث نلاحظ انه تم القضاء عليه بمساحة قدرها (22مم)، ولهذا فهذه النبتة لها قدرة كبيرة مضادة للفطريات .

بينت الدراسة المضادة للالتهاب ان النبتة قلوبلاريا اليبوم يحتوي على قدرة مضادة لالتهاب بالنسبة لمستخلص المائي رقم 1 (بتركيز 5%) هو 21.31%. في حين بالنسبة لمستخلص المائي رقم 2 (بتركيز 10%) هو 17.85%. وقد درسنا قدرة المضادة للاكسدة IC50 من المستخلص المائي لنبتة *Globularia alypum L* هو 7.96مغ/مل.

وقد وجد حسب اختبار Writhing (Rouib et al 2012) ان هذا المستخلص المائي لديه قوة مسكنة للالم حيث نلاحظ النسب المئوية للحماية بتركيز 5% و 10% من المستخلص المائي على التوالي من 35.36% و 73.89%.

الكلمات المفاتيح :

المستخلص مائي، والنشاط المضادة للميكروبات، والنشاط المضادة للالتهابات، والنشاط المضادة للأكسدة، والنشاط مضاد للألم.

Introduction

L'homme s'est soigné par les plantes, de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes (*Kabera, 2004*). Les plantes médicinales étaient l'une des seules sources de guérisons des maladies à cette époque (*Beloued, 2009*).

Les molécules des plantes dites naturelles sont considérées comme une source très importante de médicaments; sachant que plus de 120 composés provenant de plantes sont utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont appliqués selon leur usage traditionnel (*Bérubé, 2006*).

Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires 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. (*Bahorun, 1997*).

L'Algérie, grâce à son climat diversifiée, renferme une flore très riche en plantes médicinales et aromatiques très utilisées en médecine populaire. Les secrets d'utilisation de ces plantes sont transmis de mère en fille et de génération en génération.

Le genre *Globularia* que l'on retrouve dans le pourtour méditerranéen, principalement les lieux broussailleux et secs, est communément utilisé en médecine traditionnelle en Afrique du Nord (Tunisie, Maroc, Libye et Algérie), (*Jouad et al., 2001*).

Les feuilles de *la Globulaire* sont employées comme laxatif, stomatique, purgatif et sudorifique (*Bellakhdar, 1997*). Elle sont un effet anti hypertensif et hypoglycémiant (*Ziyyat et al., 1997 ; Jouad et al., 2002 ; Zennaki et al., 2009*).

Elles sont également utilisées dans le traitement des maladies rénales, cardiovasculaires (*Jouad et al., 2001*), et sans oublié ses nombreuses vertus : anti -oxydante, anti-inflammatoire, anti-ulcère, antidiabétique, antimicrobienne, anti-leucémique, cytotoxiques et cytostatiques (*Calis, 2001*),

L'objectif de notre travail vise l'identification et la détermination par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) de certains composés phénoliques extraits à partir de cette plante médicinale, et deuxièmement la mise en évidence des activités biologiques.

Introduction

Cette étude expérimentale comporte les réalisations suivantes :

- Test phytochimique préliminaire (Screening chimique) pour identifier et déterminer les particules majoritaires des métabolites secondaires contenus dans cette plante.
- Préparation de l'extrait aqueux.
- Séparation et identification par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)
- Etude biologique des activités (antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti spasmodique et anti oxydante) pour évaluer les pouvoirs thérapeutiques attribués à cette plante.

I. 1- Historique sur les plantes médicinales:

Depuis l'antiquité l'homme a utilisé les plantes comme une source principale de nourriture, par la suite il s'est développé pour les utiliser comme médicaments et remèdes afin de soigner les différentes maladies (**Damintoti, 2005**).

Comme la transmission de savoir était orale, les connaissances acquises se sont transmises de générations en générations.

C'est seulement à partir de 4000 ans avant Jésus-Christ que l'on retrouve des documents écrits où sont mentionnés des drogues comme l'opium, la jusquiame, etc. Tandis que les civilisations babylonienne, sumérienne et égyptienne accumulent les connaissances empiriques concernant les plantes médicinales, les Arabes diffusent ce savoir autour du bassin méditerranéen (**Posset, 2004**).

Au début du siècle dernier, la médecine occidentale commence à influencer les pratiques traditionnelles en Chine et Inde et à la fin du *XVIII^e* siècle, le commerce de l'herboristerie commence à être réglementé (**Iserin, 2001**).

I. 2-Définition des plantes médicinales:

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces peuvent avoir des actions différentes suivant leur préparation (**Schauenberg, 1977**).

I. 3-Définition de la Phytothérapie:

La phytothérapie est définie comme une méthode thérapeutique qui consiste à traiter les maladies par les plantes. Chaque plante possède des vertus et des propriétés différentes (drainante, calmante, vivifiante, diurétique, etc.) (**Grunwald et Jacket, 2004**).

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 (**Bruneton, 1999**).

Dans les pays occidentaux, une personne sur quatre utilise la phytothérapie de façon régulière. C'est pourquoi le phytothérapeute doit pouvoir répondre aux demandes de ses clients, donc de se former le mieux possible (**Catier et Roux, 2007**).

I. 4-Place de la phytothérapie en Algérie

Au cours de ces cinq ou six dernières années, la phytothérapie occupe une bonne place en Algérie, on constate un véritable engouement pour les produits naturels en général et pour les produits de phytothérapie en particulier. Mais c'est surtout le résultat positif de l'utilisation des préparations à base des plantes dans le traitement de différents types de maux, qui permet de déduire que la demande du marché algérien en matière de produits de phytothérapie est de plus en plus importante (**Hachaïchi ,2009**).

II. 1- Définition des principes actifs :

Un principe actif est un produit pur, chimiquement définie, on a établi sa formule, il a un nom spécifique on en connaît les propriétés physiques, chimiques et pharmacologiques contenues dans le végétal ; le principe actif possède les propriétés physiologiques c'est-à-dire les indications thérapeutiques mais aussi sa toxicité et les risques d'effets secondaires liés à son emploi. Bien souvent le ou les principes actifs sont concentrés dans un organe de plante et à une certaine période de la végétation (*Roux et Catier, 2007*).

II. 2-Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont l'une des trois plus grandes familles de métabolites secondaires comprenant les acides phénols, les flavonoïdes et d'autres formes plus condensées comme les tanins (*Vercautern et al., 1998*), ils constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal, avec plus de 8000 structures (*Lugasi et al., 2003 ; Léger et Amiot, 2000*). Ce sont des molécules biologiques qui ont en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzoïque portant une ou plusieurs fonctions hydroxyle, modifiées ou pas, comme c'est le cas pour la plupart des substances naturelles qualifiées de métabolites secondaires, leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques (*Sarni-Manchado et Cheynier, 2006*).

a) Les acides phénoliques :

Les acides phénols sont définis par l'existence d'un noyau benzoïque portant un ou plusieurs groupements hydroxyles, ils se trouvent en général à l'état combiné (sous forme de liaison ester ou osidique). Ils appartiennent à deux groupes : les Acides hydro-benzoïques et les acides hydro-xycinnamiques.

➤ Les hydroxybenzoïques :

Incluse plusieurs molécules et les plus fréquentes sont; L'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique et le p-hydroxybenzoïque. Ces composants ont une structure de C6-C3 en commun.

➤ Les hydroxycinnamiques :

Ces molécules possèdent un cycle aromatique avec 3 carbones en plus C6 C3; par exemple : l'acide caféique, l'acide férulique, p-coumarique, et l'acide sinapique (**Nagendran, 2006**).

b) Les coumarines :

Elles constituent un groupe de lactones très largement répandues, issues de la formation d'un cycle fermé à partir de l'acide hydro-xycinnamique (acide p-coumarique) par cyclisation interne de la chaîne latérale de celui-ci (**Hopkins, 2003**). Les coumarines à l'état naturel existent non seulement sous forme hétérosidique mais aussi sous forme libre, celle-ci peut constituer les principes actifs de nombreuses plantes (**Gazengel et Orecchioni, 2001**)

c) Les Tanins:

Le mot tanins fait référence à un large groupe de polyphénols naturellement produits par les plantes. Les tanins sont des molécules solubles dans l'eau, à poids moléculaire relativement élevé, ils constituent le 3ème groupe important des composés phénoliques. Ils possèdent deux sous groupes; tanins hydrolysables et tanins condensés. (**Khababae et Vanree, 2001**).

d) Les Flavonoïdes :

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 (**Ghedira, 2005**). Plus de 4000 composés de flavonoïdes différents ont été déjà identifiés dans la nature (**Aders, 2002**). Et selon (**Ifran et al., 2005**) on distingue plusieurs classes : les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones, les chalcone, les anthocyanes....etc.

e) Les Anthocyanes :

Les anthocyanes sont l'une des principales classes des flavonoïdes (**Reven et al, 2003**). Ils forment une vaste famille de molécules aux formules chimiques très diverses dont les couleurs varient du bleu au rouge en passant par le mauve et l'orange, ils dépendent de leur structure et du PH de milieu intracellulaire (**Smouelian et al, 2009**). Ces pigments végétaux confèrent leur couleur aux fruits, aux fleurs et même aux feuilles (**Roux et Catier, 2007**), ils

s'accumulent dans la vacuole des cellules les plus externe(épiderme et hypoderme) (*Guignard, 2000*).

f) Saponosides :

Les saponosides (parfois encore appelés saponines), sont des terpènes glycosylés. Ils peuvent être des stéroïdes glycosylés, des stéroïdes, alcaloïdes glycosylés ou hétérosides tri terpéniques. Ils peuvent aussi se trouver sous formes d'aglycones (ou génines) ; ce sont les composés terpéniques ne possédant pas de glucide), appelées sapogénines. La combinaison d'un tri terpène hydrophobe et d'un glucide hydrophile confère aux saponosides des propriétés tensioactives ou de détergent qui, lorsqu'ils sont agités avec de l'eau produisent une mousse savonneuse (*Hopkins, 2003*). Le terme de saponoside est dérivé de la saponaire (saponaria) qui utilisées comme substitut du savon. Les saponosides ont un gout amer et acre provoquent, une fois ingéré, d'importantes irritations gastriques. S'ils sont injectés dans le circuit sanguin ils provoquent l'hémolyse des globules rouges. C'est là sans doute une conséquence de leurs propriétés de détergents et de leur capacité générale à rompre les membranes (*Hopkin, 2003*).

g) Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes possèdent presque une molécule d'azote qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Certains sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérées comme l'atropine (*Iserin, 2001*). Ils sont le plus souvent localisés dans les tissus périphériques des organes des plantes (écorce, téguments divers), dans les graines, les racines, voire dans certains organes clos internes que sont les laticifères. Leur biosynthèse s'effectue dans des cellules spécialisées et dans les méristèmes des racines, d'où ils sont alors transportés dans des organes de stockage (*Dietrich et al., 2009*).

II. 3- Rôle physiologique et thérapeutique des composées phénoliques :

a) - Rôle physiologique des polyphénols :

La présence des flavonoïdes ainsi que d'autres polyphénols dans quasiment toutes les parties du végétal, confère une protection considérable à la plante. Elle assure la survie de cette dernière dans les différentes conditions environnementales (climat, sols, sécheresse, rayon UV...). Ces métabolites sont doués de plusieurs rôles au sein de la plante, dont on peut citer :

a) 1- la lutte contre les agents pathogènes :

Des recherches récentes ont démontré que la teneur en polyphénols s'accroît si la plante est agressée par des bactéries, champignons, ou autres comme les rayons UV et l'élévation de la température (Mohammedi, 2006, Piquemal, 2008) cela confirme qu'ils ont un rôle important dans la défense de la plante.

a) 2- L'astringence et le goût:

L'astringence est la sensation tactile provoquée par l'ingestion de nombreux aliments, du cacao au thé, du vin rouge aux noix... Derrière cette perception de râpeux ou de sécheresse, se cachent des polyphénols. Il s'agit plus précisément des proanthocyanidines ou tannins condensés, des polymères de flavanols qui contribuent aussi à l'amertume. D'un point de vue chimique, ces polyphénols provoquent la précipitation des protéines salivaires, entraînant avec elles leur cortège de molécules d'eau qui lubrifie alors la muqueuse buccale (Mohammedi 2006 ; Guggenbühl 2003).

a) 3- la couleur de la plante :

La coloration des fleurs, fruits, et des feuilles de la plante est due à la présence des substances organiques colorantes; qui absorbent seulement certaines longueurs d'onde de la lumière et émettent celle que nous percevons comme la couleur des fleurs. Les facteurs qui peuvent influencer la couleur apparente sont : L'acidité : Le PH varie dans les vacuoles de 2,5 à 7,5. La cyanidine (anthocyane), prendra une coloration rouge en milieu acide, violette en milieu neutre et bleue en milieu basique (Piquemal, 2008).

a) 4- l'attraction et la pollinisation :

Ces métabolites, polyphénols et flavonoïdes interagissent aussi dans le phénomène d'attraction, la couleur de la plante est considérée comme un signal visuel aux insectes pollinisateurs. Dans certains cas, les flavonoïdes servent pour éloigner les prédateurs. Il existe même des flavonoïdes qui sont toxiques pour certains insectes qui sont néfastes pour la plante (Marfak 2003 ; Mohammedi 2006).

a) 5- Composés phénoliques et symbiose :

L'existence d'une symbiose entre les légumineuses (trèfle, luzerne, pois, soja, haricot...) et des bactéries du genre Rhizobium permet à la plante d'acquérir la faculté de fixer directement

l'azote atmosphérique. Les flavonoïdes possèdent un rôle important et primordial dans ce phénomène biologique. Ils représentent le premier niveau de spécificité entre la plante hôte et les différentes lignées bactériennes. (**Lahlah 2008, Kechkar 2008, Mohammedi 2006**)

b) - Rôle thérapeutique des composées phénoliques :

b) 1– propriété antioxydante :

C'est la capacité de capter ou de piéger les radicaux libres produits spontanément et d'une façon continue dans l'organisme vivant. Grâce à leurs fonctions phénoliques qui ont un fort caractère nucléophile, les tanins sont d'excellents piègeurs de radicaux libres et de nombreux tanins présentent aussi des propriétés anti-oxydantes (**Bruneton, 1999**).

b) 2- Activité antibactérienne :

Plusieurs études in vitro et in vivo sont focalisées pour l'évaluation des propriétés antibactériennes, et antifongiques des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. L'action inhibitrice des flavonoïdes sur la croissance bactérienne était étudiée par (**Katarzyna et ses collaborateurs ,2007**). Ils ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempférol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à gram négatif (*Escherichia coli*...) et gram positif (*Staphylococcus aureus*...).

3 - Propriété anti-inflammatoire :

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols, peuvent prévenir de la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils inhibent l'enzyme NOS responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est déclencheur chimique de l'inflammation. (**Lahlah, 2008**). D'autres études, affirment l'action inhibitrice de ces flavonoïdes, plus particulièrement la lutéoline, l'apigénine, catéchine sur la cyclo-oxygénase enzyme synthétiques des molécules impliquées fortement dans le processus inflammatoire. (**Gérotti, 2006**)

b) 4 - propriétés préventives des maladies cardio-vasculaires :

Le rôle inhibiteur des flavonoïdes sur l'oxydation in vitro des lipoprotéines de faible densité (LDL) fait sujet de nombreuses études. L'oxydation de ces molécules est en partie la cause des lésions dues à l'accumulation de dépôts lipidiques (essentiellement cholestérol) dans les vaisseaux sanguins. (**Fuorocci, 2006**). L'effet des flavonoïdes réside dans leurs capacités de

diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leurs résistances. (**Lahlah, 2008**).

b) 5- propriétés anticancéreogènes :

Récemment, une étude vise à évaluer l'effet hépatoprotecteur de plusieurs polyphénols, plus particulièrement des **flavonoïdes** sur les dommages causés à l'ADN des cellules hépatiques par divers composés hépatotoxiques et carcinogènes (qui oxydent les bases, et cause la rupture des deux brins d'ADN). La myricétine et la quercétine ont permis de diminuer la rupture des 2 brins d'ADN et le taux de pyrimidines oxydées, par contre ils n'ont aucun effet sur les purines oxydées. Les catéchines ont permis de limiter la rupture des deux brin d'ADN ainsi l'oxydation des bases purines. (**Delgado et al ., 2008**).

b) 6- Propriétés préventives des flavonoïdes sur les neurones :

D'autres études basées sur la recherche des propriétés inédites des flavonoïdes, ont pu confirmer l'effet de ces composés vis-à-vis la maladie de parkinson qui se caractérise par une dégénérescence (dénaturation) des neurones, dont l'inflammation joue un rôle dans l'apparition de cette maladie. Les chercheurs ont observé que la luteoline inhibait de manière dose-dépendante la perte de neurones. (**Chen et al., 2008**)

b) 7- Propriétés des flavonoïdes vis-à-vis des allergies :

Des chercheurs ont comparé les effets de 6 flavonoïdes (**astragaline, fisetine, kaempferol, myricétine, quercétine, et rutine**) sur les réactions inflammatoires allergiques. L'action pharmacologique de ces molécules suggère qu'elle pourrait présenter un intérêt dans le traitement des désordres allergiques (**Park et al ., 2008**).

Chap. III : Présentation de la plante

III. 1-Description morphologique de la plante *Globularia alypum* L.

Globularia alypum est un arbuste ou sous-arbrisseau buissonnant et très rameux, à tige érigée, haute de 30 à 60 cm. Ses tiges sont dressées. Ses rameaux latéraux sont stériles.

Les feuilles sont alternes ou fasciculées (en forme de faisceau), persistantes et coriaces souvent entières, se terminant en pointe Elles font de 1 à 1.5 cm de long sur 2 à 5 mm de large ; elles sont ponctuées de glandes blanchâtres (Djerroumi et Nacef, 2004).

La fleur est petite et odorante. Son péricline a des écailles nombreuses. Le calice est persistant, a deux lèvres inégales .La corolle est bleu clair ou bleu violacé.

Les fruits sont des Akènes inclus dans le calice persistant (Ulmen ,1998). La période de floraison va de l'hiver jusqu'au début du printemps.



Figure 01 : Aspect de *Globularia alypum* L. (Bemd.L, 2013).

Chap. III : Présentation de la plante

III. 2-Etymologie :

Français : Globulaire, Séné sauvage (**Lucienne, 2010**).

Algérie : Tasselgha, Verga, Chelgha (**Bouabdelli et al., 2012**).

Maroc : Einlarneb (**Bnoubdelli et al., 2002 ; Sijelmassi,2008**).

Tunisie : Zriga (**Khelifi et al., 2011**).

Noms communs : Alype, herbe terrible, Thés arabe.

Noms vernaculaires : Aïoun, Chelgha, Zrika, Zeriga, Tasselaa, Thaselgha, Sina bladi.

III. 3-La systématique : selon **Argue (1993)** et **Taskova (2005)**, la Globulaire est classée comme décrit ci-dessous :

Règne	→	<i>Plantae</i>
Embranchement	→	<i>Spermaphytes</i>
S/ Embranchement	→	<i>Angiosperme</i>
Classe	→	<i>Dicotylédone</i>
Sous classe	→	<i>Asteridae</i>
Ordre	→	<i>Scrophulariales</i>
Famille	→	<i>Globulariaceae</i>
Espèce	→	<i>Globularia alypum</i>
Sous Espèces	→	<i>-Eu alypum</i> <i>-Arabica</i>

III. 4-Répartition géographique

L'aire de répartition de l'espèce *Globularia alypum L.* est entièrement méditerranéenne ; on le trouve préférentiellement dans les endroits secs du littoral méditerranéen.

Elle est présente dans les pays du Maghreb, ainsi que dans certain pays d'Europe méridionale.

(En France, Grèce et en Turquie) et jusque dans les milieux secs des pays d'Asie centrale (*Ait Youssef,2006*).

III. 5-Les activités biologiques de l'espèce *Globularia alypum L.*

Des études biologiques confirment que les espèces du genre *Globularia* présentent des activités antimicrobiennes, cytotoxiques, cytostatiques, anti-oxydantes et anti inflammatoires également des activités anti hypertensives et antidiabétiques (**Calis, 2001**).

Des travaux ont montré que les extraits de parties aériennes réduisent de manière considérable les contractions induites par l'histamine et la sérotonine sur l'utérus du rat. Les extraits de tiges et feuilles ont manifesté des effets antioxydants significatifs et les auteurs suggèrent le rôle possible des polyphénols dans cette activité (**Khelifi et al., 2005**).

D'autres travaux ont porté sur les activités anti leucémiques (**Caldes, 1975**) et anticancéreuses, ou les chercheurs estiment que la globulaire a, pour ces deux types de pathologies, des potentialités à explorer (**Graham, 2000**).

III. 6-Usages traditionnels et thérapeutiques des espèces du genre *Globularia* :

Depuis des millénaires, les espèces du genre *Globularia* sont utilisées en médecine traditionnelle par les turques pour calmer et traiter les douleurs rhumatismales et pour ses effets laxatifs et diurétiques (**Boutiti, 2004**).

Au nord de l'Afrique elle est largement utilisée et réputée pour ses vertus thérapeutiques :

- En Algérie, cette espèce est utilisée en médecine traditionnelle autant que stimulante, antiseptique, hypoglycémiant, laxatif, sédatif et stomachique. Elle est aussi utilisée pour le traitement de la constipation (**Bouabdelli et al., 2012**).

Elle est employée pour le traitement des maladies cardiovasculaires et rénales (**Ben Mansour et al., 2012**).

- En Tunisie, cette plante est utilisée pour le traitement des maladies de la peau ainsi que pour l'eczéma. Elle est aussi utilisée pour le traitement des troubles digestifs, pour

calmer les douleurs intestinales, l'hypertension artérielle, les problèmes cardiovasculaire, le diabète et la colique néphrétique (**Ben Mansour et al., 2012**).

- Quant à la médecine traditionnelle marocaine ; cette espèce est employée pour ses propriétés : laxatif, sudorifique, purgative, fébrifuge Cholagogue, Stomatique (**Sijelmassi , 2008**). Elle est aussi utilisée pour le traitement des troubles gastro-intestinaux (**Chokri et al., 2010**).

III. 7-La toxicité :

La globulaire n'a pas la réputation d'être toxique. Des équipes marocaines ont étudié la toxicité orale de l'infusion des parties aériennes sur des rats. La DL50 estimée à 10 g/kg ainsi que les données de la toxicité chronique (paramètres biochimiques, hématologiques et examen anatomie-histopathologique) amènent les auteurs à conclure que la globulaire n'est pas toxique (**Jouad et al., 2002**). Toutefois, certains auteurs rapportent une action toxique sur la reproduction : l'administration orale d'extraits de feuille, à raison de 800 mg/kg pendant 30 jours, s'est traduite par une résorption embryonnaire et par une réduction notable du nombre de fœtus viables (**Elbetieha et al., 2000**).

Circonstances de l'intoxication :

Le danger viendrait de son emploi en cures « au long cours » pour traiter des constipations chroniques ou le diabète. En Algérie on recommande aux diabétiques de l'utiliser en cures de durée limitée à trois semaines avec des périodes de repos (**Maiza, 2008**).

Symptomatologie de l'intoxication :

A forte dose, elle provoquerait des diarrhées, coliques, vertiges, céphalées, frissons, douleurs des membres, hypothermie et ralentissement du pouls (**Bellakhdar, 1997**).

Matériel

L'étude et la réalisation de ce travail a nécessité des stages pratiques pendant une durée de trois mois dans trois endroits différents à savoir :

- ✚ SAIDAL Médéa : pour effectuer les tests des activités anti inflammatoire, anti spasmodique, anti oxydante et l'analyse qualitative par Chromatographie sur couche mince (CCM).
- ✚ Laboratoire de microbiologie et d'hygiène de Faroudja à Blida : pour effectuer l'activité anti microbienne.

I-Matériel biologique

I. 1-Matériel végétal :

La partie aérienne de la plante (*Globularia alypum L*) d'un poids environ 1 kg a été cueillie en avril 2014 à chabet el Ameur dans la wilaya de Boumerdes.

Le poids de la matière végétale séchée est de : 320 g de feuilles.

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 (Alger).

1- Séchage: Les échantillons de *Globularia alypum* ont été débarrassés de la poussière, du sable et autres particules à l'eau courante, puis séchés pendant quinze jours.

2- Broyage: Les échantillons séchés sont réduits en poudre grâce à un broyeur électrique.

3 -Tamisage : Le tamisage a été réalisé à l'aide d'un tamis dont le diamètre est de 2mm.

4- La conservation et le stockage : La poudre obtenue est conservée dans un récipient en verre et stockée à l'abri de la lumière. Cette poudre a servi pour la préparation de l'extrait aqueux.

I. 2- Matériel animal :



Figure 02: Les souris utilisées.

L'étude réalisée au niveau de SAIDAL Médéa (laboratoire de toxicologie) a porté sur les souris Albinos (**Fig. 02**) ayant les caractéristiques suivantes :

-Sexe : mâle et femelle.

- Poids : 19 à 21g

-Nombre : 48 dont 24 ont servis pour la réalisation de l'activité anti spasmodique et 24 pour le test de l'activité anti inflammatoire.

Conditions d'élevage :

-Boisson : Eau de robinet

- Alimentation : granulés fournies par l'O.N.A.B

-Condition d'hébergement : $\left\{ \begin{array}{l} -T : 20 \text{ à } 24 \text{ C}^\circ . \\ - \text{Humidité} : 50\% . \\ - \text{Eclairage} : \frac{10h}{24H} . \end{array} \right.$

I. 3-Les souches microbiennes :

L'activité anti microbienne a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie et d'hygiène de Faroudja à Blida sur quatre souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*,

Bacillus subtilis, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, une levure : *Candida albicans* et un champignon *Aspergillus* (tableau I).

Tableau I : Caractéristiques des souches microbiennes utilisées.

Souches bactériennes	Type des bactéries	Références
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	ATCC 6569
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram +	ATCC 6633
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	ATCC 9027
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	ATCC 4157
Levure		
<i>Candida albicans</i>		ATCC 24433
Champignon		
<i>Aspergillus brasiliensis</i>		ATCC 16404

ATCC: American Type Culture Collection

II. Les Méthodes :

II.1-Test phytochimique préliminaire (Screening chimique) :

Ce mode opératoire a pour but la mise en évidence de la composition chimique de la plante *Globularia alypum L.* Selon le protocole de **Bruneton (1999)**, les tests ont été effectués à SAIDAL de Médéa.

Préparation de l'infusé :

On met 20g de poudre dans 100 ml d'eau distillée bouillante, on laisse infuser pendant 15mn, après filtration, le filtrat est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

a)-Mise en évidence des anthocyanes :

On rajoute quelques gouttes d'ammoniaque $\frac{1}{2}$ à 5ml d'infusé, la réaction donne une coloration bleue en présence des anthocyanes.

b)- Mise en évidence des leuco anthocyanes :

2g de poudre végétal sont additionnées à 20ml d'un mélange de propanol /acide chlorhydrique (1/1) puis sont portés en bain marie bouillant pendant quelque minutes, la réaction donne une coloration rouge en présence des leuco anthocyanes.

c)-Mise en évidence des tanins :

A 5ml d'infusé on rajoute quelques gouttes d'une solution de $Fe Cl_3$ a 5%.La réaction donne une coloration bleu noire en présence des tanins.

d)-Mise en évidence des quinones libres :

2g de poudre végétale humectés par 2ml d'acide chlorhydrique N, sont mis en contact pendant 3h dans 20ml de chloroforme, puis filtrés, Le filtrat est agité avec 5ml d'ammoniaque, il y a formation d'une coloration rouge en présence des quinones libres.

e)- Mise en évidence des saponosides :

A 2ml d'infusé on rajoute quelque gouttes d'acétate de plomb, la formation d'un précipité blanc indique la présence des saponosides.

f)- Mise en évidence des alcaloïdes :

Faire macérer 5g de poudre végétale humecté avec l'ammoniaque (1/2) pendant 24h dans 50ml d'un mélange éther chloroforme (3/1), le filtrat est épuisé par l'acide chlorhydrique 2N. Des réactions de précipitations sont effectuées sur la solution chlorhydrique, en présence d'alcaloïdes, le réactif de Dragendroff donne un précipité rouge.

g)- Mise en évidence des flavonoïdes :

A 5ml d'infusé additionner 5ml d'HCl, un copeau de Mg et 1ml d'alcool iso-amylique. La réaction d'une coloration rouge orange en présence des flavonoïdes.

II.2-Préparation de l'extrait aqueux :

Méthode :

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, 10g de poudre végétal sont mis en présence de 60ml d'eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite le mélange est filtré et l'extrait aqueux est récupéré (**Fig. 03**).

La concentration est de 16,6%.



Figure 03: Préparation d'un extrait aqueux

II.3- Analyse qualitative par Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Principe :

Cette méthode repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile (**Ekoumou 2003, Debete 2005**).

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire (qui peut être un gel de polyamide ou de silice) fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide 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 (**Ferrari, 2002**).

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

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

- La phase stationnaire : Une couche d'environ 0,25mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de paris) l'amidon ou polymère organique.

- L'échantillon : Environ un microlitre (1μ) 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 : il migre lentement le long de la phase en entraînant les composants de l'échantillon (**Anton et Marchal, 1998**).

b)- Mode opératoire :

Dans notre travail, on a utilisé des plaques de chromatographie sur couche mince de gel de silice sur un support en verre de taille 20 ×20 cm pour la séparation des fractions de l'extrait aqueux.

1)- Préparation de la phase mobile :

La phase mobile est préparée en utilisant un système de solvant composé de : Acétate d'éthyle / Acide formique / Eau distillée (65/15/20) ml (**Males et Medix-Sarie, 2001**).

2)- 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 est ensuite laissée se saturer.

3)- Dépôt des échantillons :

-Comme témoins nous avons utilisé (l'acide tannique, l'hydroquinone, para aminophénol, l'acide salicylique et la vanilline).

-L'extrait aqueux et les témoins, sont appliqués en petits spots sous forme de points déposés à l'aide d'une micropipette à 1μ m 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.

4)- 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.

5)- Révélation :

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque. Dans notre cas les taches ont été visibles grâce à la 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.

4)- identification :

Pour chaque spot on a calculé le facteur de rétention qui est égal à la distance parcourue par le constituant sur la distance parcourue par le solvant, sachant que plusieurs facteurs peuvent influencer sur la valeur du R_f ex : la qualité de l'absorbant, la qualité du solvant, la concentration de l'échantillon, la saturation de la cuve (**Treki 2002**).

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

$$R_f = d/D$$

✚ **d** : Distance parcourue par le constituant.

✚ **D** : Distance parcourue par le front de l'élan.

II.4-Test de l'activité antimicrobienne :

Cette activité a pour but d'étudier qualitativement l'effet antimicrobien de l'extrait aqueux de *Globularia alypum* par la méthode de diffusion sur un milieu solide.

Sur des boites de Pétri on verse le milieu MH pour les bactéries et le milieu SAB pour les levures.

Des souches bactériennes sont ensemencées sur ces boîtes.

Des disques chargés de l'extrait aqueux sont déposés à la surface des milieux de cultures.

a- Principe :

Cette méthode consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne des l'extrait aqueux de *Globularia alypum* en le mettant en présence des germes testées.

Des disques absorbants stériles sont imprégnés de l'échantillon à tester puis 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.

b)- Protocole expérimental:

1. Les souches du test :

On a choisi de travailler sur 6 espèces pathogènes qui sont :

Staphylococcus aureus, *Bacillus subtilis*, *et* (bactérie à gram positif).

Pseudomonas aeruginosa et Escherichia coli (bactéries à gram négatif).

Candida albicans (Levure) et *Aspergillus* (champignon) .

Ces espèces sont procurées par le service de Microbiologie du laboratoire d'hygiène de Faroudja (Blida).

2. Repiquage des bactéries :

Les bactéries sont ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant les milieux spécifiques et incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées.

A partir de ces boîtes, des colonies isolées des différentes bactéries sont incubées pendant 24 heures dans des bouillants nutritifs à 37°C, pour obtenir une croissance bactérienne optimale.

3. Préparation des disques :

On utilise des disques de 9 mm de diamètre préparés en papier wattman n°1, et autoclaves pendant 20 minutes à 120°C. Ces disques stériles sont plongés dans l'extrait aqueux.

4. Application du test :

Dans des boîtes de Pétri stérile, le milieu de culture Muller Hinton (MH) est coulé. Laisser pendant 15 min pour se solidifier, déposer ensuite 3µl de bactéries ensemencées à l'aide d'un râteau.

Les disques déjà préparés et chargés d'extrait sont déposés sur la surface.

Après ces boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

5. La lecture :

L'apparition d'une zone claire autour du disque appelée " zone d'inhibition " après incubation est considérée comme un résultat positif (**Fig. 05**).

Les résultats sont exprimés en (mm) en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse .Plus ce diamètre est grand plus la souche est sensible aux extrait et plus il est petit, elle est dite intermédiaire ou résistante.

Selon **Meena et Sethi, (1994)**, les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne sont classés en quatre (04) catégories :

- Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la $ZI \geq 28$ mm
- Modérément inhibitrice lorsque $16\text{mm} \leq$ le diamètre de la $ZI \leq 28$ mm.
- Légèrement inhibitrice lorsque $10\text{mm} \leq$ le diamètre de la $ZI \leq 16$ mm.
- Non inhibitrice lorsque le diamètre de la $ZI \leq 10$ mm.

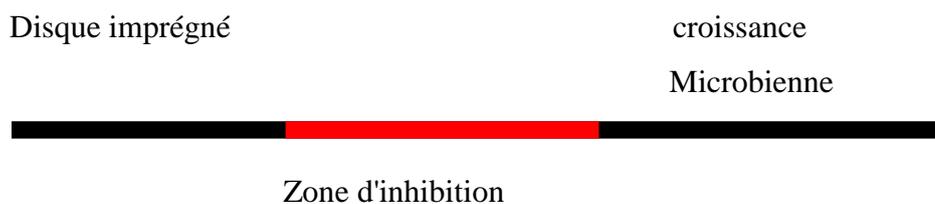


Figure 05 : Schéma démonstratif de la lecture de diamètre des zones d'inhibitions des souches bactériennes.

II.5- Evaluation de l'activité anti inflammatoire :

Selon **Okokon et al, (2006)**, la distribution et le mécanisme d'action des anti-inflammatoires seraient proche des phénomènes observés chez l'homme, vue que la souris est l'espèce la plus comparable à l'humain sur le plan métabolique.

a)-Principe : Test de Levy

Le principe consiste à injecter, sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de la souris, la carraghénine provoquant ainsi une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un produit anti-inflammatoire.

Ce test nous a permis de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration de doses égales du produit à tester et celui de référence.

Préparation des solutions :

- ✚ Préparations de deux doses de l'extrait aqueux de la plante à 5% et 10%.
- ✚ la solution de carraghénine à 1% utilisée est composée de: 0,1g de la carraghénine solide dans 10 ml d'eau physiologique voir (**annexe 02**).

b)-Mode opératoire :

1)-Répartition des animaux :

Les souris ont été réparties en 4 lots de 6 souris :

- 1 Lot témoin
- 1 Lot référence
- 2 Lots essais

2)-Administration et injection :

Au temps T_0 (gavage) :

Dans notre cas les souris ont été mises à jeun pendant 18h, après nous avons administré par voie intra-gastrique (**Fig. 06**) les solutions suivantes ;

- Lot témoin : chaque souris a reçu 0,5ml l'eau physiologique ;
- Lot référence : chaque souris a reçu 0,5ml du produit de référence (**Diclofénac**) à la même dose active.
- Lots essais N° 1 : chaque souris a reçu 0,5ml de l'extrait aqueux à 5%.
- Lots essais N° 2 : chaque souris a reçu 0,5ml de l'extrait aqueux à 10%.



Figure 06 : Gavage des souris.

Au temps $T_0 + 30$ min :

Les souris des trois lots ont reçu 0,025ml de la suspension de carraghénine et cela par injection sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche (**Fig.07**).



Figure 07 : Injection de la carraghénine sous l'aponévrose plantaire de patte arrière gauche de la souris.

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.

3)-Expression des résultats :

-Calculer les moyennes arithmétiques des poids de la patte gauche et la patte droite pour chaque lot.

- Calculer le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (% d'œdème) par la formule suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{\text{moyenne des poids de patte droite} - \text{moyenne des poids de patte gauche}}{\text{moyenne des poids de patte droite}} \times 100$$

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

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}} \times 100$$

II.6- Evaluation de l'activité anti spasmodique :

L'activité antalgique de l'extrait aqueux de la plante *Globularia alypum* a été réalisée après injection de l'acide acétique à des souris, ce qui a provoqué des douleurs avec étirement des pattes postérieures.

Si le nombre de crampes est éliminé ou réduit après administration de l'extrait de la plante, alors on peut dire que cette plante a un pouvoir antalgique.

a)-Principe :

L'injection de l'acide acétique par voie intra péritonéale 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, et du produit de référence (Paracétamol).

b)-Mode opératoire :

Selon le test de Writhing (**Rouibi et al., 2012**) l'activité antispasmodique a été effectuée au niveau du laboratoire de toxicologie de SAIDAL Médéa.

1)-Répartition des animaux :

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

- 1 Lot témoin
- 1 Lot référence
- 2 Lots essais

2)-Administration et injection :

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 : 0.5 ml de la solution de paracétamol à la dose 2mg/ml.

-Lots essais : $\begin{cases} 0,5 \text{ ml d'extrait aqueux à } 5\% \\ 0,5 \text{ ml d'extrait aqueux à } 10\% \end{cases}$

Au $T_0 + 30 \text{ min}$:

Injection à toutes les souris un volume de 0,2 ml d'acide acétique à 1% par voie intra péritonéale (**Figure 08**).



Figure 08 : Injection de l'acide acétique aux souris.

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.

3)-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.

$$\% \text{ de protection} = \frac{\text{moyennes des crampes du lot Témoin} - \text{moyennes des crampes du lot Essai}}{\text{moyennes des crampes du lot Témoin}} \times 100$$

II.7- Evaluation de l'activité antioxydante (DPPH):

Cette activité a pour but d'étudier le pouvoir anti oxydant de l'extrait aqueux de *Globularia alypum L* par la méthode de DPPH (Test de piégeage du radical libre)

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-Diphenyl -1-picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en (2,2Diphenyl-1-picryl hydrazine) de couleur jaune.

b- Protocole :

Le test utilisant le DPPH a été réalisé en suivant la méthode décrite par **Ben Mansour et al., (2012)**. L'antioxydant utilisé dans notre étude comme témoin positif est l'acide ascorbique.

1)- Préparation de la solution du DPPH :

Le DPPH est solubilisé dans du méthanol absolu, c'est à dire dans le même type de solvant que celui utilisé pour préparer l'échantillon et ses dilutions.

On prépare 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol.

2)-Préparation des solutions à différentes concentration :

On prépare cinq tubes à essai, dans chaque tube on introduit un mélange de l'extrait aqueux et on ajuste avec du méthanol jusqu'à l'obtention d'un volume de 1ml, puis on rajoute 3,9 ml de la solution déjà préparé de DPPH à chaque tube.

Après agitation les tubes sont placés à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 mn et ce pour chaque concentration.

La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 515nm par un spectrophotomètre.

2)-contrôle négatif (blanc) :

Pour chaque dilution, on prépare un blanc, le contrôle négatif est composé de 1ml de la solution DPPH (0,3nM) et de 2,5ml de méthanol.

3)-Contrôle positif :

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un anti oxydant standard (acide ascorbique), dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon test

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

$$I\% = \frac{[(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})]}{\text{Abs test}} \times 100$$

c)- Calcul des IC50 :

L'IC50 ou concentration inhibitrice de 50% (est la concentration de l'échantillon testée qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH) .Ces IC50 sont déterminées graphiquement à partir des graphes tracés dont l'abscisse représente la concentration des fractions testées et l'ordonné représente l'activité antioxydante en pourcentage.

Résultats et discussion

I- Etude phytochimique :

Les résultats inscrits dans le tableau II sont obtenus à partir des tests phytochimiques réalisés sur les feuilles de *Globularia alypum L.* Ils nous ont permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaires.

Tableau II : Résultats du test phytochimique.

Composants chimiques	Résultats	Réactions
Les anthocyanes	–	Absence de la couleur bleue
Les leuco-anthocyanes	–	Absence de la couleur rouge
Les tannins	+++	Présence de la couleur bleue noire
Les Quinones libres	–	Absence de la couleur rouge
Les saponosides	++	Présence d'un précipité blanc
Les alcaloïdes	+	Présence d'un précipité rouge
Les flavonoïdes	+++	Présence de la couleur Rouge orange

- Absence de métabolite secondaire recherché.
- + Présence de métabolite secondaire sous forme de trace.
- ++ Présence de métabolite secondaire en quantité moyenne.
- +++ Présence de métabolite secondaire en grande quantité.

D'après le **tableau III**, il s'avère que les feuilles de « *Globularia alypum L* » contiennent plusieurs catégories de métabolites secondaires :

Les résultats obtenus montrent clairement la présence massive des tannins et des flavonoïdes. Les saponosides sont également présentes mais en quantité moindre.

Les alcaloïdes sont aussi présents mais sous forme de trace.

Quant aux anthocyanes, aux leuco- anthocyanes et aux quinones libres ils n'ont pas pu être identifiés par le test phytochimique.

Les résultats du screening chimique révèlent que notre plante contient beaucoup de composés phénoliques. Cette richesse en polyphénols confère à *Globularia alypum L* des vertus thérapeutiques importantes. De nombreux travaux réalisés sur d'autres plantes ont montré que :

Résultats et discussion

- les polyphénols exercent un effet anti-inflammatoire, ils sont des inhibiteurs de la transcription des facteurs stimulants de la réaction inflammatoire. Ils sont aussi des antiarthritiques (Cheeke et al., 2006).
- Les flavonoïdes et les composés phénoliques présentent une activité anti-inflammatoire, antioxydante et une activité anti-cancérogène (Ehsan et al., 2011).
- Les flavonoïdes, tannins et les saponines exercent une activité cicatrisante (Angnimel et al., 2007).
- Les tannins sont doués d'activité antibactérienne, antifongique, antivirale et anti-inflammatoire (Biaye, 2002).

II- Chromatographie sur couches minces (CCM) :

Cette technique nous a permis de déterminer certains constituants de l'extrait aqueux de la plante *Globularia alypum*.

L'éluant: Acétate d'éthyle/Acide formique/Eau distillée (65/15/20) ml.

La révélation chimique par $H_2 SO_4$ a permis d'avoir une visibilité acceptable des spots (Fig.09).

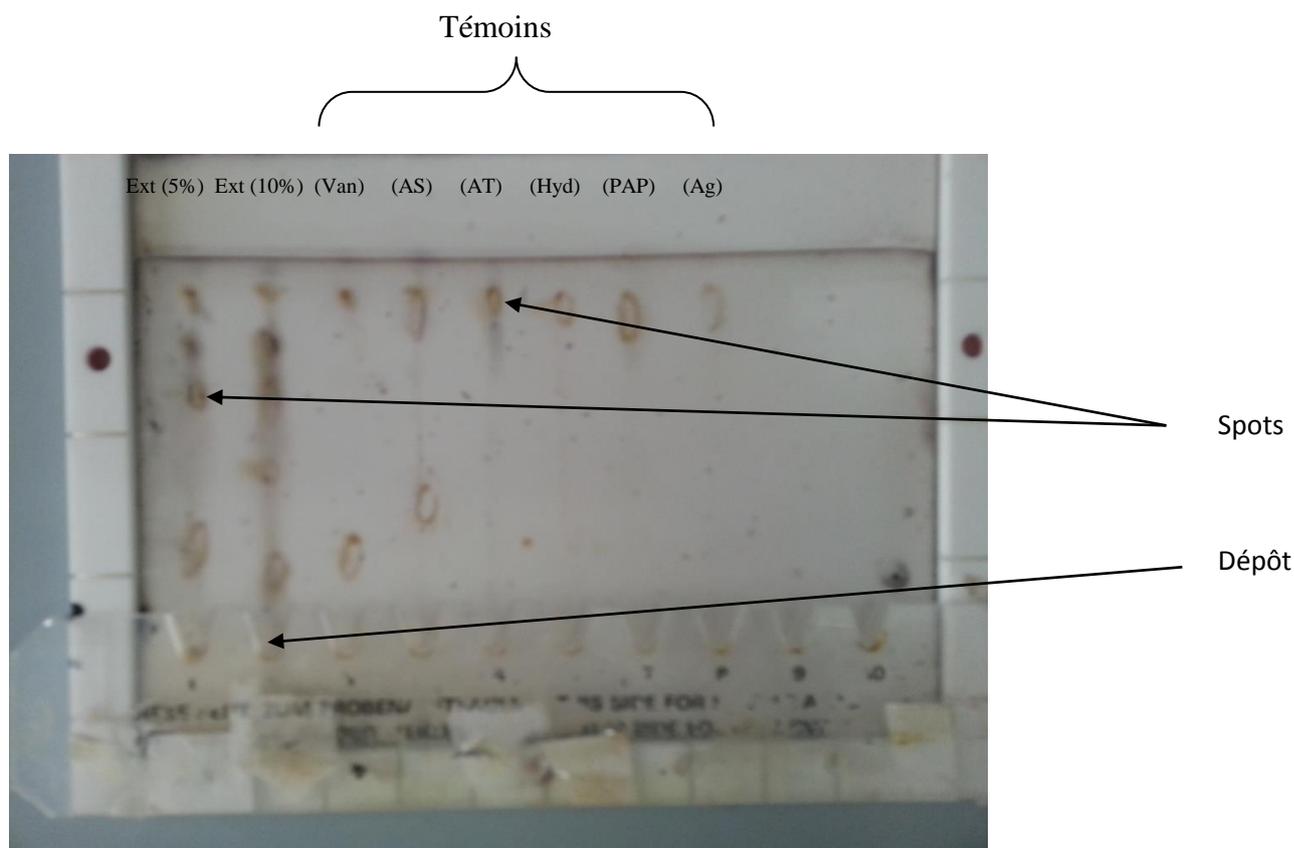


Figure 09 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de *Globularia alypum L* après révélation chimique par $H_2 SO_4$.

Résultats et discussion

Les valeurs des rapports frontaux (Rf) des témoins utilisés : Vanilline (Van), Acide tannique (AT), Acide salicylique (AS), Hydroquinone (Hyd), Para-aminophénol (PAP) sont donné dans le tableau suivant :

Tableau III : Valeurs des rapports frontaux:

Étalons	Valeurs du Rapport frontal des étalons
Vanilline (Van)	0.33
Acide salicylique (AS)	0.44
Acide tannique (AT)	0.88
Hydroquinone (Hyd)	0.83
Para-aminophénol (PAP)	0.91
Acide gallique (Ag)	0.93

Le CCM nous a permis d'observer quatre spots dans l'extrait aqueux n° 1 (5%) et cinq spots dans l'extrait aqueux n° 2 (10%). Après comparaison des valeurs du rapport frontal des spots des étalons avec les spots des extraits aqueux n° 1 et n° 2 de *Globularia alypum*, nous avons pu identifier trois composés qui sont l'Acide gallique (0.93), l'Acide Tannique, (0.88) et l'Hydroquinone (0.82) (Tableau IV).

Trois autres composés n'ont pas pu être identifiés car leur Rf n'a pas la même valeur que ceux des témoins utilisés.

Tableau IV : Rapport frontaux des l'extraits utilisés :

Désignation	Valeurs du Rapport frontal de l'extrait aqueux n° 1	Valeurs du Rapport frontal de l'extrait aqueux n° 2
Spot n° 1	0.35	0.27
Spot n° 2	0.69	0.47
Spot n° 3	0.81	0.69
Spot n° 4	0.88	0.82
Spot n° 5	/	0.93

La CCM nous a permis de déterminer la qualité de nos différents extraits, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituants précis, elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs de nos extrait grâce au facteur de rétention.

Résultats et discussion

En 2011, **khlifi et al** ont étudié l'extrait des feuilles de *Globularia alypum L* en utilisant le solvant méthanol à 75%. Ils ont pu déterminer les polyphénols, les tannins, les anthocyanes et les flavonoïdes.

D'autres travaux de recherche ont été réalisés sur cette espèce parmi eux on peut citer :

- **Bernard et al, (1974)** ont étudié les feuilles du *globulaire* originaire de France où ils ont isolé les composés suivants : globularine, catalpol, rutine, luteoline 7-glucoside, acide cinnamique, acide caféique, acide tannique, acide ferulique, acide p-coumarique, acide chorogénique.
- **Benhassine et al, (1982)** a étudié la partie entière de la plante cueillie en Tunisie où ils ont identifié les composés suivants : 4',7-dihydroxyflavone, apigénine-7-glucoside, quercétol, luteoline-7-glucoside, 8-C-glucosyl-4', 7-dihydroxyflavone, rutoside, cyanidine, peonidine, Vanilline, acide syringique, acide caféique, acide tannique, acide sinapique, acide p-coumarique, acide ferulique, acide b-resorcylique.

Ces études montrent que cette plante contient plusieurs principes actifs.

III – Résultats de l'activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux a été étudiée sur quatre souches bactériennes, une levure et un Champignon.

L'efficacité de l'extrait est traduite par la présence d'une zone d'inhibition.

Le diamètre de cette zone observée détermine le degré de sensibilité des bactéries et levure vis-à-vis de l'extrait étudié. Les résultats obtenus sont consignés dans le **tableau V** et illustrés par la figure 10.

Tableau V : Diamètre des zones d'inhibition des souches bactériennes.

Souches bactériennes	Type des bactéries	La zone d'inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	Non inhibitrice
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram +	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	13
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	Non inhibitrice
Levure		
<i>Candida albicans</i>		12
Champignon		
<i>Aspergillus brasiliensis</i>		22

Résultats et discussion

Les zones d'inhibitions obtenues sont respectivement de **10mm** et de **13mm** en ce qui concerne les bactéries *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui montre que l'extrait testé a une action légère sur ces bactéries.

Par contre il n'a aucune action sur les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* étant donné que le diamètre de la zone d'inhibition est nul.

La zone d'inhibition du Champignon *Aspergillus* est la plus importante (**22mm**), ceci prouve que la Globulaire a un grand pouvoir anti fongique.

Concernant la Levure *Candida albicans* la zone d'inhibition est de 12mm, ce qui montre que la plante étudiée a une action légèrement inhibitrice.

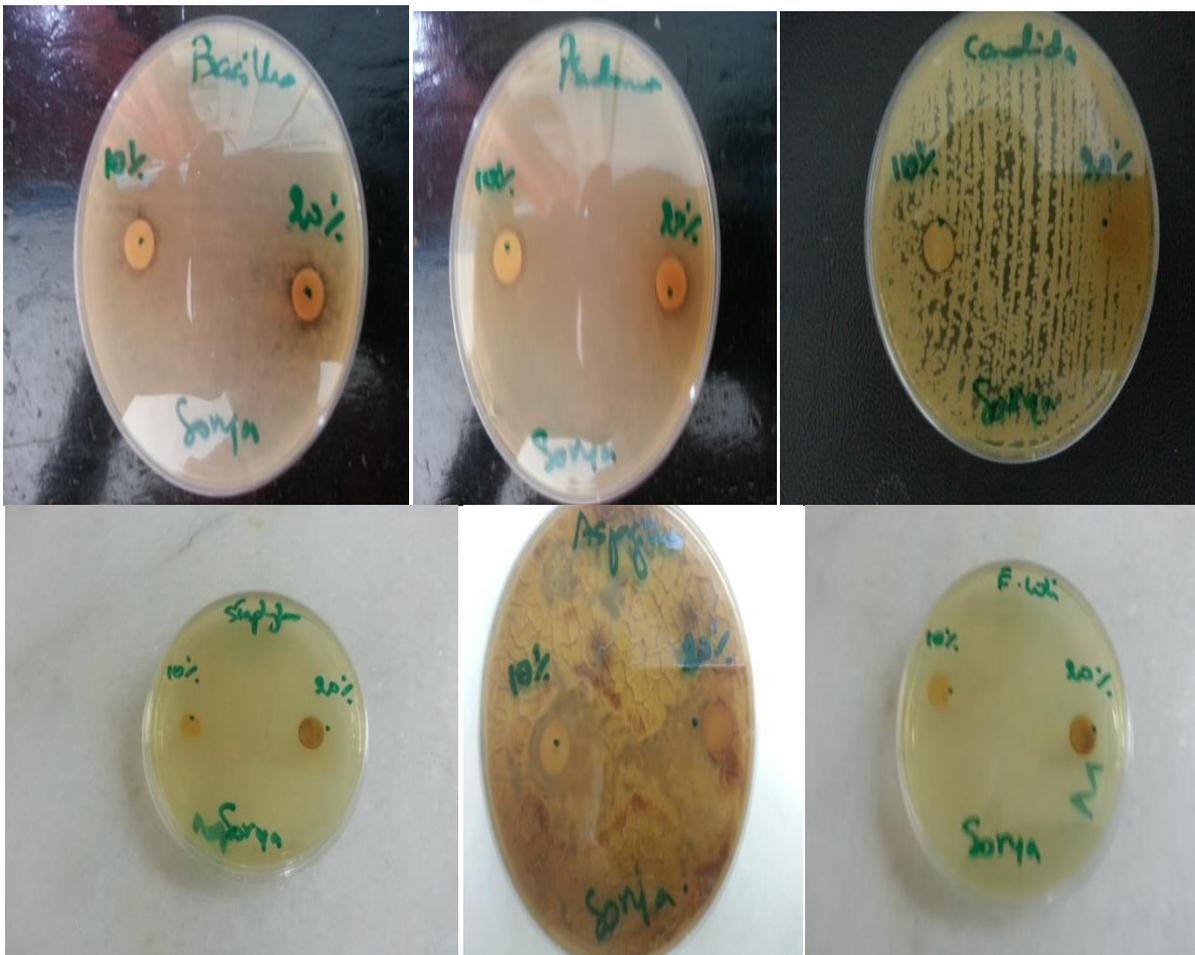


Figure 10 : Diamètre des zones d'inhibition des souches microbiennes par extraits aqueux de *Globularia alypum L.*

La comparaison de nos résultats avec ceux de **Bouabdelli et al, (2012)**, montre une certaine concordance avec ceux de notre étude.

Résultats et discussion

En effet, les tests réalisés sur des extraits obtenus par infusion, décoction et macération des feuilles de *Globularia alypum L* montrent que les extraits sont légèrement inhibiteurs vis-à-vis des souches testées (la zone d'inhibition varie entre 8 mm et 15 mm).

VI-Résultats de l'activité anti-inflammatoire:

Nous avons évalué l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de la plante *Globularia alypum* à partir des feuilles en utilisant le test de l'œdème plantaire chez les souris (**Test de Levy**).

Les résultats de l'administration de l'extrait aqueux aux souris albinos chez lesquelles nous avons provoqué l'inflammation par injection de la carraghénine 1 % dans la surface plantaire de la patte arrière gauche, sont mentionnés dans le **tableau VI (Annexe 02)** et illustrés par la figure 11.

Pour le calcul du pourcentage de réduction et d'augmentation d'œdème, il y a lieu de se référer à l'**annexe 2**.

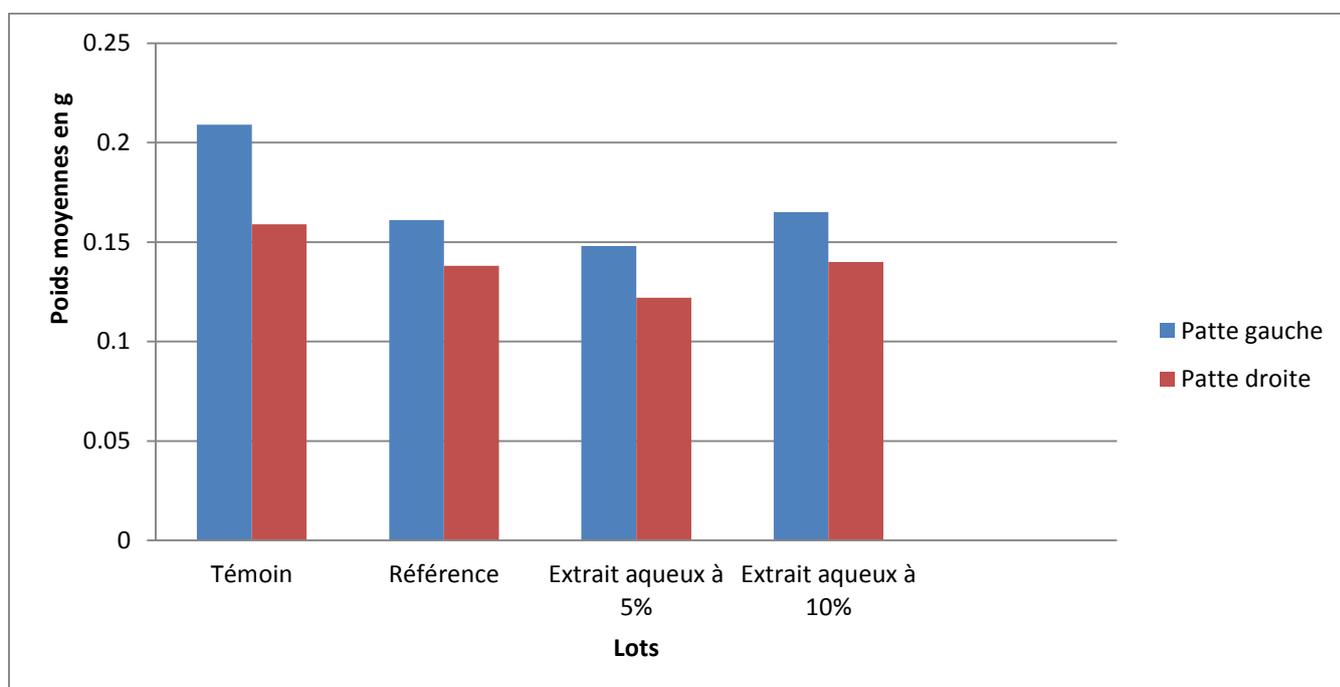


Figure 11 : Evaluation des poids moyens des pattes droites et pattes gauches des souris des trois lots.

Nous constatons que dans les mêmes conditions opératoires le gavage de l'extrait aqueux pour les lots essais 1 et 2, induit une diminution des poids moyens des pattes gauches et cela est remarquable en les comparant aux pattes droites. (**Figure 11**)

- Nous avons enregistré une diminution des poids moyens des pattes gauches du lot de référence (**P=0,161 g**) par rapport aux poids moyens des pattes gauches du lot témoin (**0,209 g**) (**Tableau VI**).

Résultats et discussion

- Cette observation est la même dans le lot essai N° 1 (extrait aqueux à 5%) c'est-à-dire une diminution de **0,061g** des poids moyens des pattes gauches par rapport aux poids moyens des pattes gauches du lot témoin (**0,209 g**) (**Tableau VI**).
- Dans le lot essai N° 2 (extrait aqueux à 10%) une diminution des poids moyens des pattes gauches (**0,165 g**) par rapport aux poids moyens des pattes gauches du lot témoin (**0,209 g**). (**Tableau VI**).

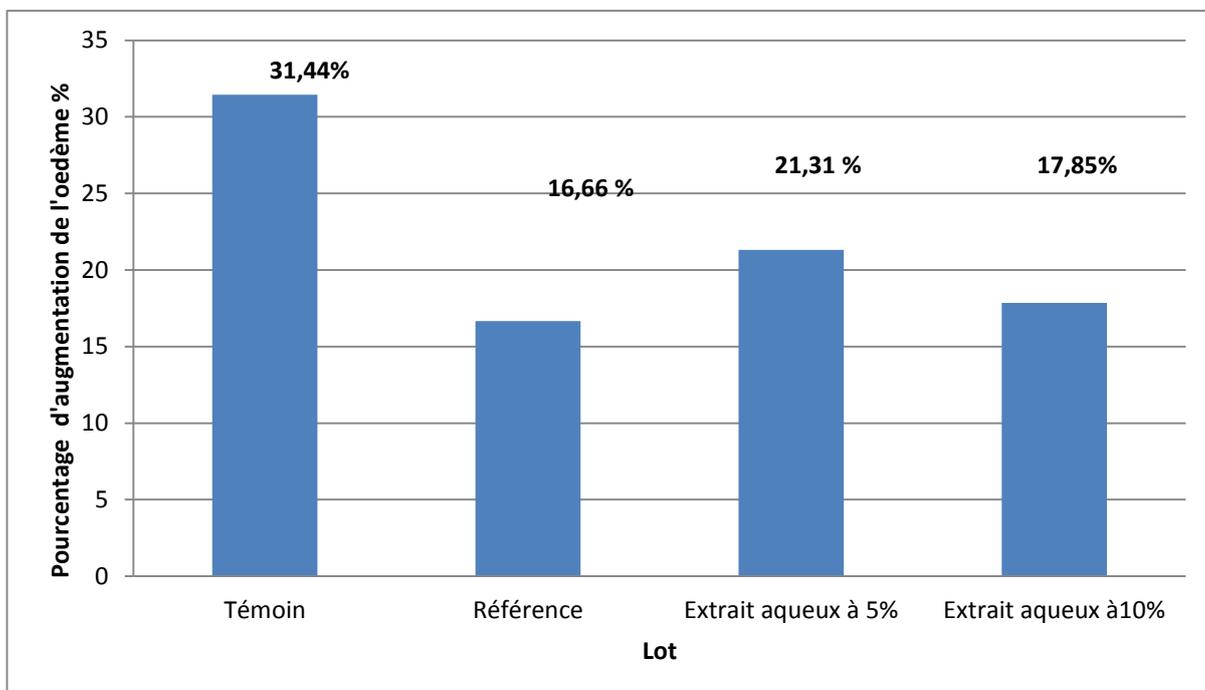


Figure 12: Pourcentage d'augmentation de l'œdème des pattes gauches par rapport aux pattes droites des trois lots.

Le pourcentage d'augmentation de l'œdème des pattes gauches par rapport aux pattes droites du lot témoin est de **31,44%**.

Concernant le lot de référence nous avons remarqué que le pourcentage d'augmentation de l'œdème est de **16,66 %**

Enfin on a constaté un pourcentage d'augmentation de l'œdème pour le lot essai N° 1 (Extrait aqueux à 5%) de **21,31 %**.

Tandis que pour le lot essai N° 2(extrait aqueux à 10%) il est de**17, 85% (Figure 12)**.

Résultats et discussion

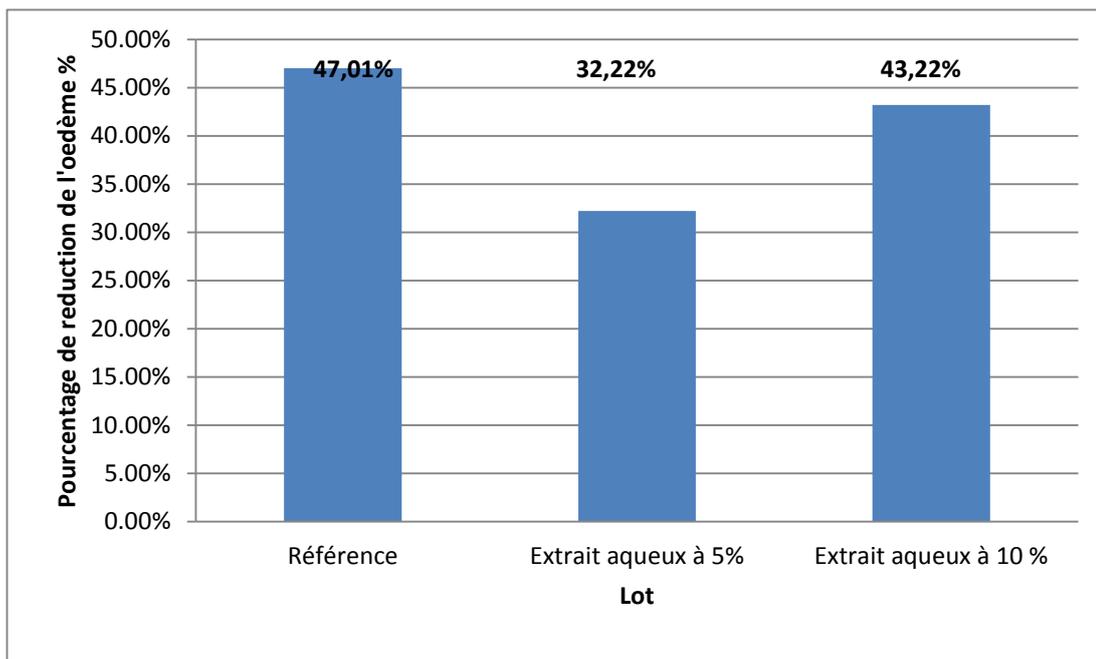


Figure 13: Pourcentage de réduction de l'œdème de lot de référence et lot essai par rapport au lot témoin.

Par ailleurs, nous avons constaté un pourcentage de réduction de l'œdème des souris traitées par le produit de référence le **Diclofénac®** par rapport au témoin qui est de **47,01%** et ce pourcentage est élevé dans le lot essai N° 1 (extrait aqueux à 5%) qui est de **32,22 %** et le lot essai N° 2 (extrait aqueux à 10%) **43,22%** (**Figure 13**). Ceci démontre le grand pouvoir anti-inflammatoire de *Globularia alypum* surtout à forte concentration, d'où l'existence du rapport dose-effet.

L'œdème à la carraghénine est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'étude des potentialités anti-inflammatoire des substances actives (**Okokon et al., 2006 ; Akindel et Adeymi ; Chouhan et al., 2012**).

La carraghénine a été prise comme un prototype de phase expérimentale de l'inflammation aigue dont les mécanismes et les médiateurs impliqués sont communs à ceux déclenchés par les microbes de stimulus inflammatoire, les produits chimiques et les cellules nécrosées (**Mule et al., 2008**)

Le développement de l'œdème après une injection de carraghénine au niveau de la patte d'une souris est attribué à la libération d'histamine, sérotonine, kinines et prostaglandines (**Akinedele et Adeyni, 2007 ; Subhan et al., 2007 ; Shankhajit et al., 2010**).

Résultats et discussion

L'inhibition de l'œdème provoqué par la carragénine au niveau des trois phases est due probablement à l'inhibition des médiateurs inflammatoires tels que l'histamine, la sérotonine, les kinines et les prostaglandines (**Das et al., 2010**) notons que la phase de libération de ces derniers est très sensible aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (**Gupta et al., 2006 ; Khabbal et al., 2006**).

Les souris ont été privé d'eau pendant la période d'expérimentation pour ne pas influencer la réaction œdémateuse. La carraghénine a provoqué un œdème visible juste après son injection et atteint son maximum à la quatrième heure, ce qui est en accord avec les travaux réalisés par **Shreedhara et al, (2009) ; Devi et Mira, (2010) ; Chauhan et al, (2012)**.

Le **diclofénac®**, utilisé dans cette étude comme substance anti-inflammatoire de référence, se caractérise par une demi-vie plasmatique de 2 heures et un intervalle d'absorption de 2 à 3 heures après son administration orale (**Jacqz-aigrain et Guillonneau, 1998**) ce qui explique l'augmentation du pourcentage d'inhibition dans les premières quatre heures et son élimination induit une diminution progressive dans les heures qui suivent, ce qui explique nos résultats (**Shedhara et al., 2009 ; Gupta et al.,2006 ; Priya et al.,2000**).

En effet le **Diclofénac®** agit sur le métabolisme des prostaglandines à travers une inhibition de COX1 et COX2, ce qui provoque la diminution de l'œdème (**Burmester et al, 2000**).

L'activité anti inflammatoire de l'extrait flavonoïque de **Globularia** peut être attribuée à sa composition chimique, c'est-à-dire à la présence de molécules actives qui constituent la source de traitement. En effet, plusieurs études révèlent que généralement, les composés impliqués dans l'activité anti inflammatoire des plantes comprennent les dérivés poly phénoliques, les stérols et les triterpènes (**karwya et al., 2010**).

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 .En limitant la réaction inflammatoire, les flavonoïdes agissent comme protecteur de la matrice en inhibant l'activité de certaines enzymes (**Jacqz-Aigrain,Guilloneau, 1998**).

Résultats et discussion

V- Evaluation de l'activité antalgique :

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

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

Les souris	Témoin	Référence	Essai 1 (5%)	Extrait 2 (10%)
Souris 1	6	2	3	3
Souris 2	8	1	14	5
Souris 3	12	3	10	2
Souris 4	16	2	2	4
Souris 5	13	3	5	3
Souris 6	10	1	8	2
Moyennes des crampes	10,83	2	7	3,16
% de protection	-	81,53	35,36	73,89

Le calcul du pourcentage de protection contre les douleurs est calculé selon la méthode suivante :

$$\% \text{ de protection de Référence} = \frac{\text{Moyenne des crampes Témoin} - \text{Moyenne des crampes Référence}}{\text{Moyenne des crampes Témoin}} \times 100$$

$$\% \text{ de protection de Essai} = \frac{\text{Moyenne des crampes Témoin} - \text{Moyenne des crampes Essai}}{\text{Moyenne des crampes Témoin}} \times 100$$

Les résultats obtenus à l'issu du test d'activité antalgique révèle qu'après 5 min de l'injection d'acide acétique par voie intra péritonéale, l'effet douloureux chez les souris est apparu sous forme des crampes.

Résultats et discussion

D'après le tableau VII on constate que le lot témoin montre un nombre moyen de crampes égal à **10,83** crampes/10 min.

Le nombre de crampes enregistrées chez le lot traité par le Paracétamol (produit de référence) est de **2**, avec un pourcentage de protection de **81,53** %, ce qui nous permet de dire que le Paracétamol supprime presque complètement les crampes induites par l'acide acétique.

Le nombre de crampes enregistrées chez le lot essai n^01 (dose de 0,5g/ml de l'extrait) réduit plus du tiers le nombre de crampes avec un pourcentage de protection de **35,36**% et le nombre moyen de crampes est de 7crampes /10min.

Chez le lot essai n^02 (dose de 1g/ml de l'extrait) le nombre de crampes 3,16 crampes /10min enregistrées est considérablement réduit avec un pourcentage de protection de **73,89**%, ce qui avoisine le lot de référence.

VI- Résultats de l'activité anti oxydante :

Le pouvoir anti oxydant de l'extrait aqueux de la plante *Globularia alypum* a été déterminé par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

Nous avons étudié l'activité anti oxydante de l'extrait aqueux de la plante afin de voir et localiser la fraction la plus active.

La capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires, les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes présentées dans la figure ci-dessous.

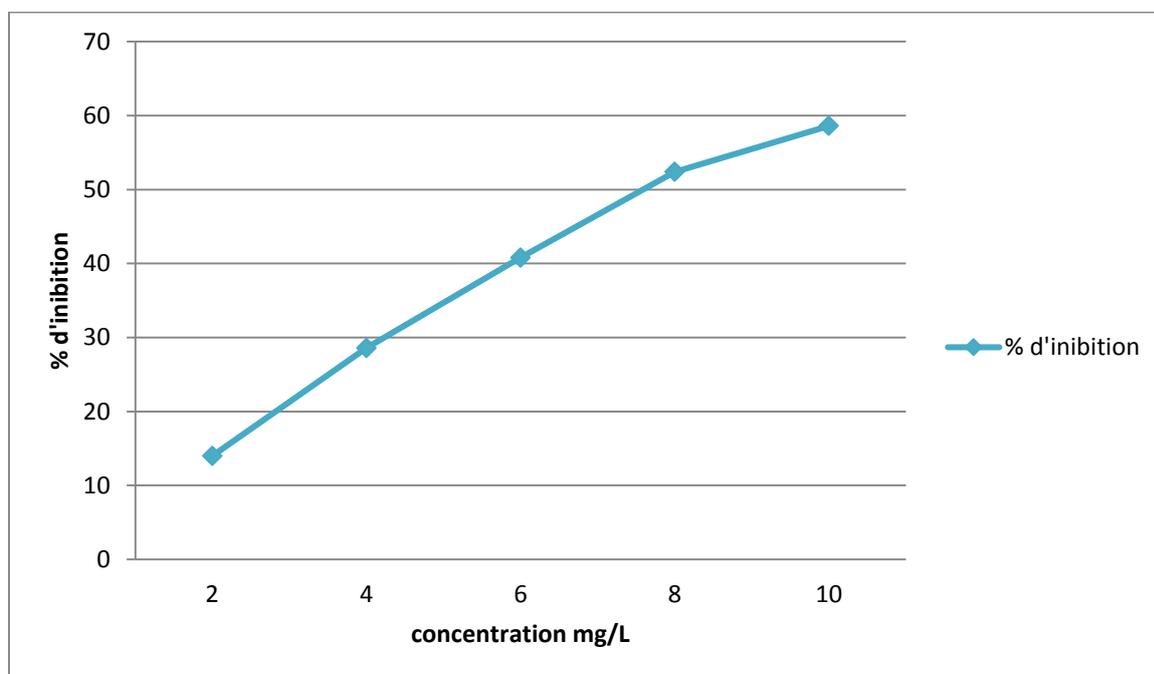


Figure 14 : Courbe d'étalonnage.

Résultats et discussion

D'une manière générale, toutes les solutions testées 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 anti oxydant, nous avons introduit le paramètre IC50, les valeurs d'IC50 de l'extrait aqueux de *Globularia alypum* sont enregistrées dans le tableau VII et illustrées par la figure 15.

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

Echantillon	IC50mg/l
Acide ascorbique	0.46
L'extrait aqueux	7.96

(a=5,65) , (b=4,98)

$$50 \% = a \times \text{IC50} + b$$

$$\text{IC50} = \frac{50 - b}{a}$$

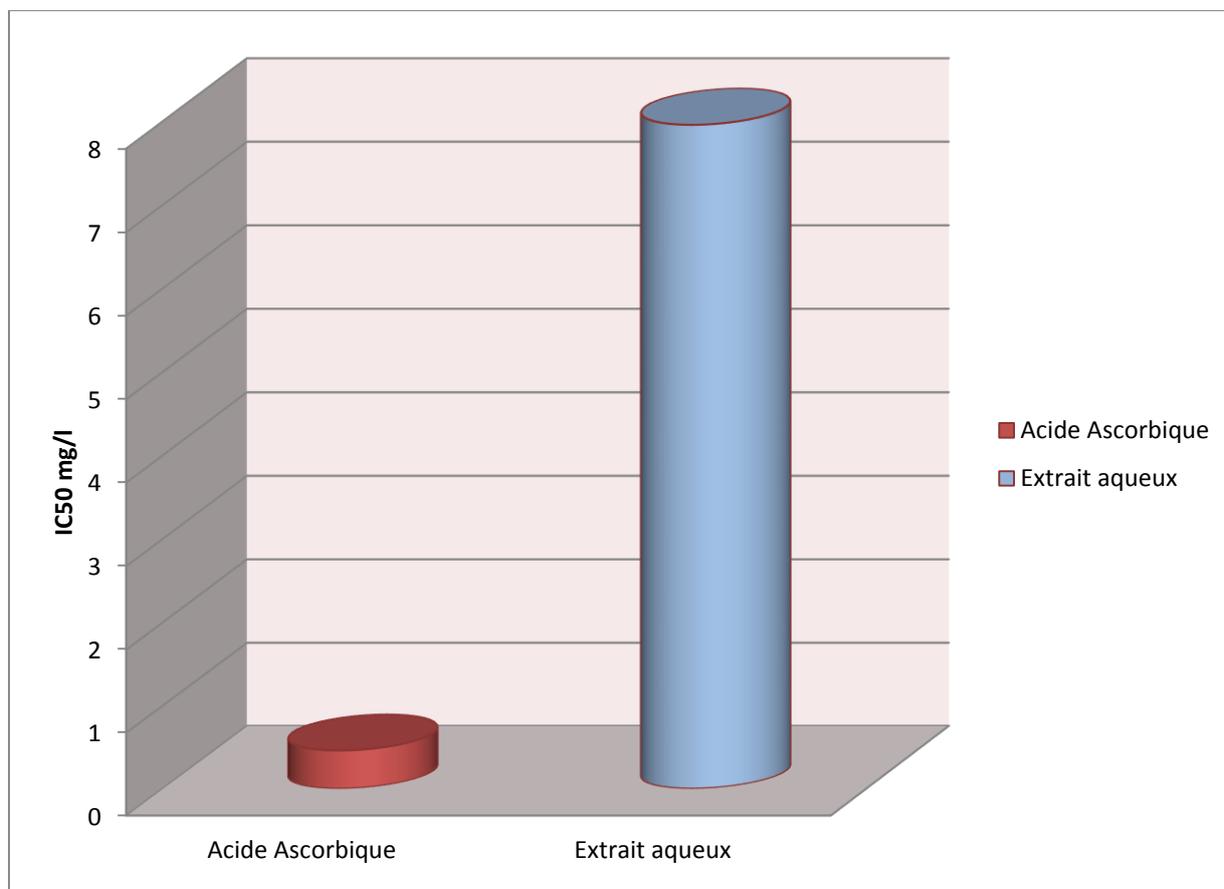


Figure 15 : Les IC50 de l'extrait aqueux de *Globularia alypum L.* et de l'acide ascorbique.

Résultats et discussion

A 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.

L'extrait de *Globularia alypum L* est actif avec une IC50 de **7,96mg/l**, ce qui démontre que notre plante possède en effet un pouvoir antioxydant.

Il a été démontré par *Khelifi et al., (2011)* que l'activité anti oxydante de l'extrait méthanolique de la plante *Globularia alypum L* 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 mg/l**.

De même, *Mansour et al., (2012)* ont trouvés dans l'extrait hydrothanolique de *Globularia alypum L* une valeur de IC50 qui égal à **6.45mg/l**.

De ce qui précède on peut conclure que la plante étudiée possède un pouvoir anti oxydant étant donné que l'IC50 de l'extrait aqueux de *Globularia alypum L* est **7.96mg/l**.

Références bibliographiques

A

- ✚ **Ait youssef M., (2006)** Les plantes médicinales de kabylie, paris:155-159 pp.
- ✚ **Akindele A. J., Adeyemi, O.O. (2007)** Anti-inflammatory activity of the aqueous leaf extract of *Byrsocarpus coccineus*. *Fitoterapia*. Vol.78, 25-28 pp.
- ✚ **Alam K., Pathak D., Ansari S.H. (2011)** Evaluation of anti-inflammatory activity of *Ammomum subulatum* fruit extracts. International journal of pharmaceutical science and drug research. Vol.3, n°1, 35-37pp.
- ✚ **Angimal L.H; Bamba M; Coulibaly S et Dally L. (2007)** Formulation, controle galénique, toxicology et essai Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of *Yucca schidigera*, A review, licence BioMed Central LTD. 1-4pp.
- ✚ **Argue. C.L., (1993).**Pollen morphology in the selagineae Manuleae (scrophulariaceae) and selected Globulariaceae and its taxonomic significance Am.J.Bot, 80, 723-733pp.

B

- ✚ **Bahorum .T, (1997)** Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle Food and agricultural Research Council.
- ✚ **Bahorum .T, (1997)** Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle Food and agricultural Research Council.
- ✚ **Bahroum T,Gressier B,Trotin F,Brunete C,Dine T,Vasseur J,Gazin J,Pinkas M,Luycky M,Gazin M,(1997).**Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations,*Arzneimittel-Forsch*,pp:1086-1089.
- ✚ **Bahroum T,Gressier B,Trotin F,Brunete C,Dine T,Vasseur J,Gazin J,Pinkas M,Luycky M,Gazin M,(1997).**Oxygen species scavenging activity of phenolic

extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations,*Arzneimittel-Forsch*,pp:1086-1089.

- ✚ **Barrault J M., Loupy M A., 2002.**Etude de nouvelle strategies de valorization de mono et polysaccharides, UFL, TD, 16p.
- ✚ **Bellakhdar J (1997)** La pharmacopee marocaine traditionnelle. Ibis Press, Paris.
- ✚ **Bellakhdar J (1997)** La pharmacopee marocaine traditionnelle. Ibis Press, Paris.
- ✚ **Beloued, plantes médicinales d'Algérie,(2009).** Office des publications universitaire,5^{ème} éd,3p.
- ✚ **Beloued, plantes médicinales d'Algérie,(2009).** Office des publications universitaire,5^{ème} éd,3p.
- ✚ **Ben Mansour B,Garirgou B,Elloumi I,Benhadjilan Z,Gharabigammar S,Lassoued,(2012).**Investigation of Antioxydant activity of ethanolic extract of *Globularia alypum L*,*Medicinal Plants Research*,4193-4199pp.
- ✚ **Benhassine, A. Bui, Z. Mighri (1982).** Plantes Médicinales et Phytothérapie, 7, 3-10 p.
- ✚ **Bernard .P, M. M. Lallemand, G. Blansard (1974),** Plantes Médicinales et Phytothérapie, 8(3), 9-74pp.
- ✚ **Bérubé-Gagnon J. (2006).** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire de l'université de Québec.
- ✚ **Bérubé-Gagnon J. (2006).** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire de l'université de Québec.
- ✚ **Biaye Mamadou. (2002)** Action pharmacologique des tannins. Université Cheikh Anta Diop de Dakar, faculté de Médecine, de pharmacie et d'Odontostomatologie.15-17-20p.
- ✚ **Bnouham, H,Mekhfi A,Legssyer A,Ziyyat,(2002).**Ethnopharmacology forum Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco,*Int J Diabetes and metabolism*,10-55pp.

- ✚ **Bouabdelli A, Djelloul OZ, Kaid A, Semmoud A, Addou, (2012).** Antimicrobial Activity of 22 Plants Used in Urilithiasis Medicine in Western Algeria, Tropical Disease, 530-535pp.

- ✚ **Boutiti ameur, 2004.** Etude phytochimique de l'espèce *Globularia alypum*.
- ✚ **Bruneton. J, (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales .Ed .Tech &Doc. 3^{ème} Edition. Paris. 309-353 pp.

- ✚ **Bruneton. J, (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales .Ed .Tech &Doc. 3^{ème} Edition. Paris. 309-353 pp.

- ✚ **Burmester, G. R., Rezzuto, A. (2000)** Atlas poche d'immunologie. Medicine-science (Flamorian), 295p.

C

- ✚ **Calis. I, Bimolecular (2001)** Aspects of Biodiversity Innovative. Nov. 3-8, 137-149pp.

- ✚ **Cartier O., Roux D. (2007)** Botanique pharmacognosie phytothérapie ; Edition, Walters Kluwers, 3^{ème} édition. 111-112pp.

- ✚ **Cheeke PR; Piacente S and Oleszek W. (2006)** Anti-inflammatory and anti-arthritis effects of *Yucca schidigera*, A review, licence BioMed Central LTD. 1-4pp

- ✚ **Chokri A, Doukali R, Elabda K, Benchikh R, (2010).** Miorelaxant and spasmolytic effects of *Globularia alypum L* on rabbit jejunium, pharmacology, pp: 608-615.

- ✚ **Chouhan H. S., Sridevi K., Singh N.K., Singh S.K. (2012)** Anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Vitex glabrata* leaves. Pak. J. Pharm. Sci. Vol. 25, 131-134pp.

- ✚ **Chung K, Wei C, Johnson M, (1998).** Are tannins a double-edged sword in biology and health, Trends in Food Science and Technology, pp: 168-175.

D

- ✚ **Damintoti K., Mamoudou H.D., Jacques S., Saydou Y., Souleymane S., et Alfred S.T. (2005).** Activités anti-oxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Mémoire de l'université de Burkina Faso.
- ✚ **Das S., Pallab K., Haldar., Pramanik G., Suresh R. B. (2010)** Evaluation of anti-inflammatory activity of *Clerodendron infortunatum* Linn. Extract in rats. *Global Journal of pharmacology*. Vol.4, n°1, 48-50pp.
- ✚ **Déllile Ali L, (2010) : les plantes médicinales d'Algérie, 2ème Ed ,138p.**
- ✚ **Devi P., Mira R. (2010)** Study of antioxidant, anti-inflammatory and wound healing activity of extracts of *Litsea Glutinosa*. *J. Pharm. Sci. Res.* Vol.2, n°2, 155-163pp.
- ✚ **Djeddi S, Bonechenal N, Settar I et Scalta H-D. (2007).** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chemistry of Naturel compound*. Vol.43.n°4-99p.

E

- ✚ **Ehsan Oskoueian;Norhani Abdullah; Wan Zuhainis Saad; Abdul Rahman Omar; Syahida Ahmad; Wen Bin Kuan;Nor Azlina Zolkifli; Rudi Hindra and Yin Wan Ho. (2011)** Antioxydant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Jatropha curcas* Linn. *Journal of medicinal Plants Recherche*. Vol.5, n°1, 49-57pp.
- ✚ **Elbetieha A, Oran A, Alkofahi a et al. (2000)** Fetotoxic potentials of *Globularia arabica*.
- ✚ **Hachaïchi S, 2009 :** Directeur médical de Mag pharm, l'efficacité clinique des traitements de phytothérapie est une réalité basée sur des preuves scientifiques. *Quotidien El Waten*, Edition du 3 décembre 2009

F

- ✚ **Fehri J M ,Aiache KM ,Ahmed,(2012).** Active spermatogenesis induced by a reiterated administration of *Globularia alypum L.*, aqueous leaf extract, pharmacognosy research, 138-147pp.

- ✚ **Fournier P, (1961) Les quatres flores de la France, Paul chevalier, Paris, 875p.**

G

- ✚ **Gupta M., Mazumder, Gomathi P., Selvan V.T. (2006) Anti-inflammatory evaluation of leaves of Plumeria Acuminata. BMC complementary and alternative medicine. Vol.6, 1-6pp**
- ✚ **Grunwald J., Jacket CH, 2004 Guide de la phytothérapie : la thérapeutique des plantes, édition marabout, pp 5-9.**
- ✚ **Grunwald J., Jacket CH, 2004 Guide de la phytothérapie : la thérapeutique des plantes, édition marabout, pp 5-9.**

H

- ✚ **H.Gaussen., H. F., Leroy. (1982) Précis de botanique (végétaux supérieures), 2eme édition, 30p**
- ✚ **Hatano.T, Kusuda.M, Inada.K, To.Ogawa, S.Shiota, T.Tsuchiya, T.Yoshida, (2005) Effects of tannins and related polyphénols on methicillin-resistant Staphylococcus aureus, photochemistry; 66, 2047p.**
- ✚ **Hazebrouq G., 1995.Dorvault l'officine23ème éd, Paris, Vigot, 1376-1377p.**
- ✚ **Hostettma, K., Potterat, O. & Wolfender, J. - L. (1998b). The Potential of Higher Plants as a Source of New Drugs. Chimia 52, 10-17p.**

I

- ✚ **Iserin P. (2001) Encyclopédie des plantes médicinales. Ed. Larousse, Paris : 14-15-335p.**
- ✚ **Lacoste. S, (2006). « Les plantes qui guérissent », L. and Globularia alypum L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats.Le Duc ;14p**
- ✚

J

- ✚ **Jouad H, Maghrani M, Eddouks M (2001) hypoglycaemic effect of Rebus fructicosis**
- ✚ **Jacqz-Aigrain E., Guilloneau M. (1998) Anti-inflammatoire EncyclMédChir (Elsevier, Paris), Encyclopédie pratique de médecine.Vol.8, n°1010, 4p**

✚ **Jouad H, Maghrani M, Eddouks M (2002)** hypoglycaemic effect of Rebus fructicosis

✚ **Jouad H, Maghrani M, Eddouks M (2002)** hypoglycaemic effect of Rebus fructicosis.

K

✚ **Kabera Nzeyumwami.,(2004).**Caractérisation des huiles essentielles de trois plantes aromatiques :*Hyptisspicigera,Plucheavalis et Laggeraurita*,mémoire en biologie et médecine,université de lomp-togo-DEA.

✚ **Karawya M.S., Ammar N.M.,Hifnawy M. S., Al-Ookbi S. Y., Mohamed D.A., El-Anssary A. A. (2010)** Phytochemical study and evaluation of anti-inflammatory activity of some medicinal plants growing in Egypt. Medical journal of Islamic world academy of sciences. Vol.18, n°4: 139-150pp.

✚ **Kabera,R.M, 2004** les plantes médicinales ALS .P58

✚ **Kabera,R.M, 2004** les plantes médicinales ALS .P58

✚

✚ **Khabbal, Y., Cadi, M. A. E., Alaoui, Faouzi, M. A., Cherrah, Y. (2006)** Activité anti-inflammatoire de *Zygophyllum Goetulum*. *Phytothérapie*. Vol.5 : 227-229pp.

✚ **Khelifi, M ;Hamdi A ;Elhayouni S ;Cazaux JP ;Sauchard F;Couderc J;Bouajila,(2011).**Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts of *Globularia alypum* L.,leaves,molecules,16,10592-10603p.

L

✚ **Lacoste. S, (2006).** « Les plantes qui guérissent », L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats.Le Duc ;14p

✚ **Lahlah Z,(2008).**Extraction des flavonoides par le butanol et le chloroforme à partir de *silybummarianum*et etude de leur activité antimicrobienne,mémoire de magister de l'université de mentouri de Constantine.

- ✚ **Lee H, Yang L, Wang C, Hu S, Changd F, Lee H, (2003).** Differential effects of natural polyphenols on neuronal survival in primary cultured central neurons against glutamate and glucose deprivation-induced neuronal death, *Brain Research*, 103-113pp.

M

- ✚ **Maiza K (2008)** Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara algérien. Thèse de Méridionales, 1963, tome II .CNRS, Paris, 860p.
- ✚ **Maneea J.L et Sethi P, (1994).** Guide des examens de laboratoire. 4^{ème} édition. 920p. Méridionales, 1963, tome II .CNRS, Paris, 860p.
- ✚ **Meziti A ,(2009).** 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.
- ✚ **Moyse H et Paris R., 1981.** Matière médicale, Tome 2, éd Masson, Paris, 343-362p.
- ✚ **Mula, W., Kuchekar, S., Thorat, V., Chapode, A., Kuchekar, B. (2010)** Anti-oxidant, anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of ethanolic extract of leaves of *Alocasia indica* (Scott). *J Young Pharm.* Vol.2, n°2, 137-143pp.
- ✚ **Mule, S. N., Ghadge, R. v., R, C. d. A., Bagul, B.A., Patil, S. B., Naikwade, N.S. (2008)** Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of leaves of *Gynandropsis Pentaphylla*. *Journal of herbal medicine and toxicology.* Vol.2, n°1:41-44pp.

N

- ✚ **Nogaret-Enrhart, A.S., (2006).** La phytothérapie : se soigner par les plantes, 12p.

O

- ✚ **Okokon J. E., Antia B. S., Ita B. N. (2006)** Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of ethanolic extract of *Setaria Megaphylla* leaves in rodents. *African journal of biomedical research.* Vol. 9 :229-233pp.



P

- ✚ **P. Quezel., S. Santa., (2002)** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et 412 p.
- ✚ **Posset.J .,2004 :** Plantes Médicinales d'Afrique ; édition :Edisud la calade 3200 route d'Avignon,p7.
- ✚ **Priya T. T., Sabu M. C., Jolly C. I. (2008)** Free radical scavenging and anti-inflammatory properties of Lagerstroemia Spesiosa (L) Inflammophacology. Vol.16, 182-287 pp.

Q

- ✚ **Quezel P et Santa S., 1963.**Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2, Paris : CNRS ,163-164pp.

R

- ✚ **Roux D.** et Catier O., 2007 : Botanique des manipulations de chimie à l'usage des biologiste. Tec et doc, Paris,p 363.
- ✚ **Rouibi A, Chabane B, Saidi F, Azine K., 2012 :**Etude comparative de l'activité anti spasmodique de l'extrait aqueux d'Ajugativa IVAN.ED bi prochaine chez les souris biologie Blida page 131 et 137 .

S

- ✚ **Shreedhara C. S., Viadya V. P., Vagdevi H. M., Latha K. P., Muralikrishna K. S., Krupanidhi A. M.(2009)** Screening of Bauhinia Purpurea Linn. For analgesic and anti-anflammatory activities *Indian J Pharmacol.* Vol. 41:75-79pp.
- ✚ **Schaunberg P., 2005 :** « Guide des plantes médicinales » Delachaux Niestlé, pp 08
- ✚ **Skim F, Lazrek BH, El Amri H et al. (1998)** Toxicological studies on Globularia alypum

- ✚ **Song J, Kim S, Chang K, Han S, Yi H, Jeon J, (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 51:1131-1140p
- ✚ **Sonogo R., Maiga A., Diallo D. (2006).** Activités analgésiques et anti-inflammatoire des extraits de *Maytenus Senegalensis*, *Stereospermum Kuntrianum* et *Triclisia Emetica* utilisées dans le traitement traditionnel des dysménorrhées au Mali. Pharm. Méd. Trad. Afr. Vol.9:123-136pp.
- ✚ **Subhan F., Nasiara K., Ibrar M. (2007)** Anti-inflammatory activity of methanolic and aqueous extracts of *valeriana Wallichii* de rhizome pak. Pl.Sci. Vol.13, n°2:103-108pp.
- ✚ **Subhashini, T., Krishnaveni, B., Reddy, C.S. (2010)** Anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Alternanthera sessilis* Hygeia J D Med. Vol.2, n°1:54-57pp.

T

- ✚ **Taskova R.M., Gotfredsen CH et Jensen, SR., 2005.** Chemotaxonomy of veroniceae and its allies in the Plantaginaceae TUD, IB, BAS: 289-294pp.
- ✚ **Terki A ,Merghem, Dehimat L ,(2002).** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée: *Thymus hirtus*, Science et Technologie, 25-29pp.
- ✚ **Treben, M., (1998).** « La santé à la pharmacie du bon dieu », Ennsthaler : 07p.

U

- ✚ **Ulmen E., (1998).** Guide des plantes du bassin méditerranée, éd Masson paris, 118p.

V

- ✚ **Volx (28/03/2014)** Provence-Alpes-Côte d'Azur - Alt. 481m
- ✚ **Vercautern J., Chezec C et Triaud J., 1998:** Les polyphénols 96.

W

- ✚ **Walz M., Edourd M. et Hekel L., (1982).** Travaux originaux thérapeutique de la Globularine et Globularétine, FSM : 182p.

Z

- ✚ **Zhang G. Q. A., Huang X.D. A., Wang b. H., Leung B. A. K. N., Chan B.C.L., Fong D. W. F. B., Zhi-Ling Y. (2008)** Anti-inflammatory and analgesic effects of the ethanol extract of Rosa Multiflora Thumb. Hips. Journal of ethnopharmacology. Vol.118: 290-294pp.
- ✚ **Zimmer N,Cordesse R,(1996).**Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments desruminants,INRA Productions Animals,167-179pp
- ✚ **Ziyyat et al,1997 ; Jouad et al,2002 ; Zennaki et al, 2009)** le traitement des maladies par la plante Globularia alypum L.

Résultats et Discussion

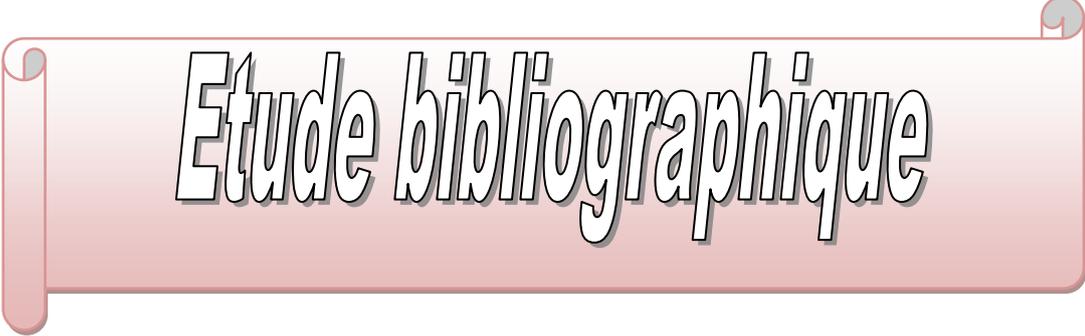


ANNEXE

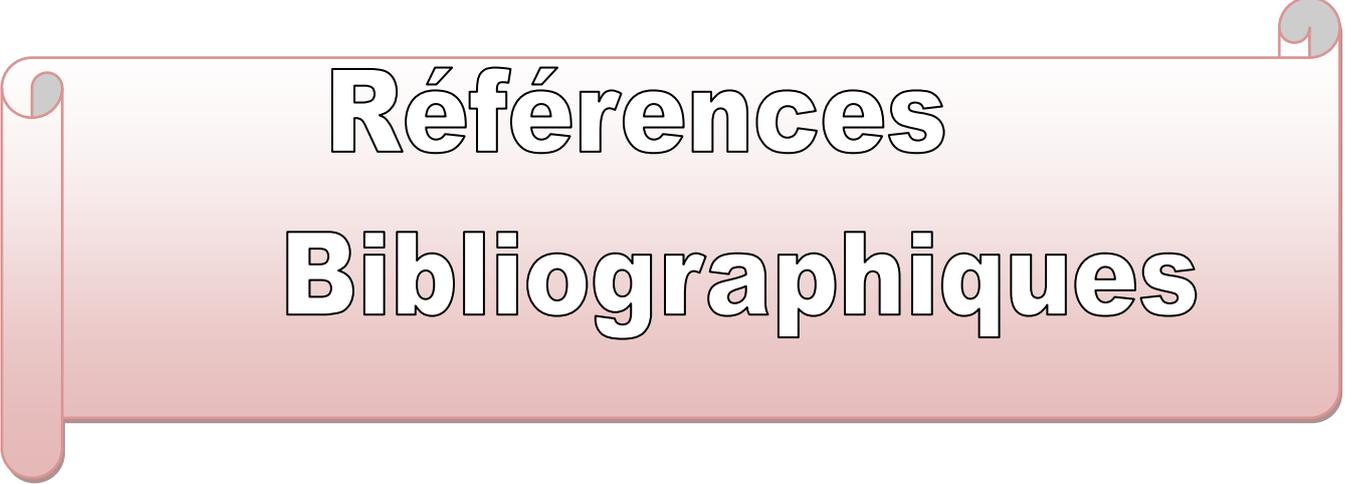
Matériel et Méthodes



Introduction



Etude bibliographique



Références

Bibliographiques



Conclusion