

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

Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par
Drai Meriem



En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière
 Filière : Chimie
 Spécialité : Chimie des Produits Naturels

Titre

**Extraction et caractérisation de l'huile essentielle et étude
 de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits
 de «*Globularia alypum*»**

Soutenu publiquement le 03 juillet 2017 devant le jury composé de :

| | | | |
|-------------|-----|--------------|---------------------|
| H. BOUTOUMI | MCB | Président | Université de Blida |
| N. Bouzidi | MCB | Examinatrice | Université de Blida |
| O. TOUAFEK | MCA | Promotrice | Université de Blida |

Promotion 2016-2017

Dédicaces

C'est grâce à Dieu le tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que je dédie :

A MES CHERS PARENTS



A toutes mes sœurs " Amel, Khadidja, Fadwa, Nadjat "

A mon frère " Mohammed "

*A mes collègues et spécialement tous les étudiants du master
2 chimie des substances naturelles*

*A tous mes profs qui m'ont assisté pour la préparation de ce
glorieux projet de recherches scientifiques.*



Remerciements

Je tiens en premier lieu, à remercier Allah le tout puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Tout d'abord, je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à ma promotrice **M^{me}. O. TOUAFEK**, qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, par sa grande patience, par sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Mes remerciements s'adressent également à **Mr. H. BOUTOUMI**, professeur à l'université de Blida 1 qui a accepté de présider le jury de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à **M^{me}. N. Bouzidi**, maître de conférence à l'université de Blida 1, d'avoir accepté de juger ce travail.

Un remerciement chaleureux et sincère à tous nos enseignants, membres de l'équipe pédagogique du master, «Chimie des produits naturels», pour l'effort qui ont fourni tout au long du cycle.

A toute personne qui a participé de près ou loin, à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous.



Résumé

Le présent travail porte sur l'étude de la composition chimique et l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'espèce *Globularia alypum*, qui appartient à la famille *Globulariaceae*.

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation de la partie aérienne de la plante sèche a été analysée par GC et GC/MS. Cette analyse a montré la présence de 35 Composés dont les constituants majoritaires sont : le phytol (11.104%) et le (+) spathuléol (7.031%).

L'évaluation de la teneur en composés phénoliques de trois extraits (acétate d'éthyle, méthanolique et acétonique), en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé que l'extrait le plus riche en ces composés était l'extrait d'acétate d'éthyle avec une teneur de 50 mg/g d'extrait.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH des mêmes extraits a montré que l'extrait acétonique possède le pouvoir antioxydant le plus élevé.

L'effet antimicrobien des extraits étudiés vis-à-vis 4 souches bactériennes et 2 souches fongiques a également été démontré.

Mots clés : *Globularia*, *Globularia alypum*, huile essentielle, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

The present work concerns the study of the chemical composition and evaluation in vitro of antioxidant activity and antimicrobial activity of the *Globularia alypum* species, which belongs to the family of *Globulariaceae*.

The essential oil obtained by hydrodistillation of the air part of the dry plant was analyzed by GC and GC/MS. This analysis showed the presence of 35 compounds whose majority constituents are: the phytol (11.104 %) and the (+) spathulenol (7.031 %).

The evaluation of the phenolic content of three extracts (ethyl acetate, methanolic and acetic) by adopting the Folin-Ciocalteu method revealed that the richest extract of these compounds was the extract of ethyl acetate with a content of 50 mg / g of extract.

The evaluation of antioxidant activity by the method of trapping of the free radical DPPH of the same extracts showed that the acetic extract possesses the highest antioxidant power.

The antimicrobial effect of the studied extracts of the 4 bacterial strains and 2 fungal strains has also been demonstrated.

Keywords: *Globularia*, *Globularia alypum*, essential oil, total phenolics, antioxidant activity, antimicrobial activity.

ملخص

يركز هذا العمل على دراسة التركيب الكيميائي وتقييم المختبر من مضادات الأكسدة ونشاط مضادات الميكروبات للعشبة من نوع *Globularia alypum*، الذي تنتمي إلى عائلة *Globulariaceae*. تحليل الزيت العطري الذي تم الحصول عليه عن طريق التقطير البخار من الجزء الخارجي للنبات الجاف من GC و MS/GC أظهر وجود 35 مركبا والتي تعتبر مكونات رئيسية هي: phytol (11.104%) و (+) spathuléol (7.031%).

كشفت تقييم محتوى المركبات الفينولية من ثلاثة مستخلصات (خلات الإيثيل، والميثانول والأسيتون)، وذلك باعتماد طريقة فولين-Ciocalteu أن العنصر الذي يحتوي على أكبر كمية من هذه المركبات هو خلالات إيثيل حوالي 50 ملغ / غرام.

تقيم النشاط المضاد للأكسدة عن طريق أسلوب محاصرة من DPPH الجذور الحرة من نفس المستخلصات أظهر أن مستخلص الأسيتون لديها أعلى قوة مضادة للأكسدة.

ظهور تأثير مضادات الميكروبات للمستخلصات ضد 4 سلالات بكتيرية واثنين من سلالات فطرية.

كلمات البحث: *Globularia alypum*، *Globularia*، من الضروري النفط، المركبات الفينولية، والنشاط المضادة للأكسدة، والنشاط المضادة للميكروبات.

Abréviations

- HE** : Huile essentielle
- EMé** : Extrait méthanolique
- EAn** : Extrait acétonique
- EHxb** : Extrait hexanique brut
- EHx** : Extrait hexanique
- EC** : Extrait Chloroformique
- EAc** : Extrait acétate d'éthyle
- EÀqu** : Extrait aqueux
- R** : Rendement
- NaOH**: Hydroxyde de sodium
- mg**: Milligramme
- mm**: Millimètre
- nm**: Nanomètre
- C**: Concentration
- Abs** : Absorbance
- UV**: Ultra-violet
- CCM**: Chromatographie sur couche mince
- R_f**: Rapport frontal
- IRTF**: Infrarouge à transformée de Fourier
- GC/MS** : chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse
- DPPH** : 2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl
- CI₅₀** : Concentration efficace médiane
- µl** : Microlitre
- MH** : Muller Hinton
- SAB** : Sabouraud
- d** : Diamètre
- ATF** : Antifongiques
- ATB** : Antibiotique

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1: Structure générale des flavonoïdes..... | 5 |
| Figure 2: Structure de quelques classes des flavonoïdes..... | 5 |
| Figure 3: Schéma illustrant la biosynthèse des flavonoïdes..... | 6 |
| Figure 4 : Structure de quelques flavonoïdes isolés du genre <i>Globularia</i> | 9 |
| Figure 5: Formation de phényléthanoïdes..... | 10 |
| Figure 6 : Structure de quelques phényléthanoïdes isolés du genre <i>Globularia</i> | 13 |
| Figure 7: Structure du squelette iridane..... | 13 |
| Figure 8 : Structure de quelques classes des iridoïdes..... | 14 |
| Figure 9: La biosynthèse du loganine à partir du GPP..... | 15 |
| Figure 10 : Structure de quelques iridoïdes isolés du genre <i>Globularia</i> | 20 |
| Figure 11 : Quelques exemples de constituants des huiles essentielles..... | 21 |
| Figure 12: <i>Globularia alypum</i> L..... | 23 |
| Figure 13 : Les principaux métabolites secondaires isolés de l'espèce <i>Globularia alypum</i> ...28 | |
| Figure 14 : <i>Globularia alypum</i> sèche..... | 31 |
| Figure 15 : Protocole d'extraction 1..... | 32 |
| Figure 16 : Protocole d'extraction 2..... | 33 |
| Figure 17: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique..... | 36 |
| Figure 18 : Histogramme représente le taux des phénols totaux des extraits méthanolique (EMé), acétate d'éthyle (EAc) et acétonique (EAn)..... | 38 |
| Figure 19 : Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation..... | 41 |
| Figure 20 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>Globularia alypum</i> | 45 |
| Figure 21 : Réaction de test de DPPH (2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl)..... | 46 |
| Figure 22 : Le pourcentage d'inhibition des extraits testés et de la vitamine C..... | 49 |
| Figure 23 : Histogramme de CI ₅₀ des différents extraits de <i>Globularia alypum</i> et de la vitamine C en mg/ml..... | 50 |
| Figure 24 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibitions des extraits (EMé, EHx et EAn) relatives aux différentes souches microbiennes..... | 55 |
| Figure 25 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibitions des extraits (EMé, EHx, EAn), de l'ATB et de l'ATF1 et ANTF2 relatives aux différentes souches microbiennes..... | 55 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau N° 1 : Répartitions géographiques de quelques espèces du genre <i>Globularia</i> | 3 |
| Tableau N° 2 : Usages et propriétés de quelques espèces du genre <i>Globularia</i> | 4 |
| Tableau N° 3 : Quelques flavonoïdes isolés du genre <i>Globularia</i> | 7 |
| Tableau N° 4 : Quelques phényléthanoïdes isolés du genre <i>Globularia</i> | 11 |
| Tableau N° 5 : Quelques iridoïdes isolés du genre <i>Globularia</i> | 16 |
| Tableau N° 6 : Composants majoritaires ($\% \geq 3.5$) d'huiles essentielles des espèces du genre <i>Globularia</i> | 22 |
| Tableau N° 7 : Les principaux métabolites secondaires isolés de l'espèce <i>Globularia alypum</i> | 25 |
| Tableau N° 8 : Représentation de la composition d'huile essentielle de <i>Globularia alypum</i> en provenance de Sétif et de Khenchela..... | 29 |
| Tableau N° 9 : Couleur, aspect, masse et rendement des différents extraits de la plante <i>Globularia alypum</i> | 34 |
| Tableau N° 10 : Résultats des tests phytochimiques des extraits (EMé et EAn) de <i>Globularia alypum</i> | 35 |
| Tableau N° 11 : Taux des polyphénols existant dans les extraits EAc, EMé et EAn de <i>Globularia alypum</i> | 38 |
| Tableau N° 12 : Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits de l'espèce <i>Globularia alypum</i> | 40 |
| Tableau N° 13 : Couleur, aspect, masse et rendement de l'huile essentielle de <i>Globularia alypum</i> | 42 |
| Tableau 14 : Composition de l'huile essentielle de <i>Globularia alypum</i> | 43 |
| Tableau N° 15 : Absorbance et pourcentage de l'activité antiradicalaire des différentes concentrations des extraits (EAc, EMé et EAn) et du standard vis-à-vis le radical libre DPPH..... | 48 |
| Tableau N° 16 : Valeurs de CI_{50} des extraits EMé, EAc et EAn de <i>Globularia alypum</i> et de la Vit. C..... | 49 |
| Tableau N° 17 : Codes des différentes souches microbiennes étudiées..... | 52 |
| Tableau N° 18 : Diamètre des zones d'inhibitions (mm) des l'extraits (EMé, EHx et EAn) et d'ATB relatives aux différentes souches bactériennes..... | 54 |
| Tableau N° 19 : Diamètre des zones d'inhibitions (mm) des l'extraits (EMé, EHx et EAn) et des ATFs relatives aux différentes souches fongiques..... | 54 |

SOMMAIRE

| | |
|----------------------------|---|
| Dédicace | |
| Remerciements | |
| Résumé | |
| Liste des abréviations | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Sommaire | |
| Introduction générale..... | 1 |

Chapitre 1 : Recherche bibliographique sur le genre *Globularia*

| | |
|---|----|
| 1. Présentation botanique et géographique de la famille <i>Globulariaceae</i> | 2 |
| 2. Présentation botanique du genre <i>Globularia</i> | 2 |
| 3. Répartition géographique..... | 2 |
| 4. Usages traditionnels..... | 3 |
| 5. Propriétés biologiques..... | 3 |
| 6. Travaux antérieurs sur le genre <i>Globularia</i> | 4 |
| 6.1. Les composés phénoliques..... | 4 |
| 6.1.a. Les flavonoïdes..... | 5 |
| 6.1.a.1. Généralité..... | 5 |
| 6.1.a.2. Les flavonoïdes isolés du genre <i>Globularia</i> | 7 |
| 6.1.b. Les phénylétanoïdes glycosides..... | 10 |
| 6.1.b.1. Généralité..... | 10 |
| 6.1.b.3. Les phénylétanoïdes glycosides isolés du genre <i>Globularia</i> | 11 |
| 6.2. Les iridoïdes..... | 13 |
| 6.2.a. Généralité..... | 13 |
| 6.2.b. Biosynthèse des iridoïdes..... | 14 |
| 6.2.a.6. Les iridoïdes isolés du genre <i>Globularia</i> | 15 |
| 6.3. Les huiles essentielles..... | 21 |
| 6.3.1. Généralité..... | 21 |
| 6.3.2. Les huiles essentielles du genre <i>Globularia</i> | 21 |
| 7. Aperçu bibliographique sur l'espèce <i>Globularia alypum</i> | 23 |

| | |
|--|----|
| 7.1. Présentation botanique et répartition géographique..... | 23 |
| 7.2. Classification dans la systématique botanique..... | 23 |
| 7.3. Usages traditionnels et activités biologiques..... | 24 |
| 7.4. Travaux antérieurs sur les métabolites secondaires de l'espèce <i>Globularia alypum</i> | 24 |
| 7.5. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles de l'espèce <i>Globularia alypum</i> | 28 |

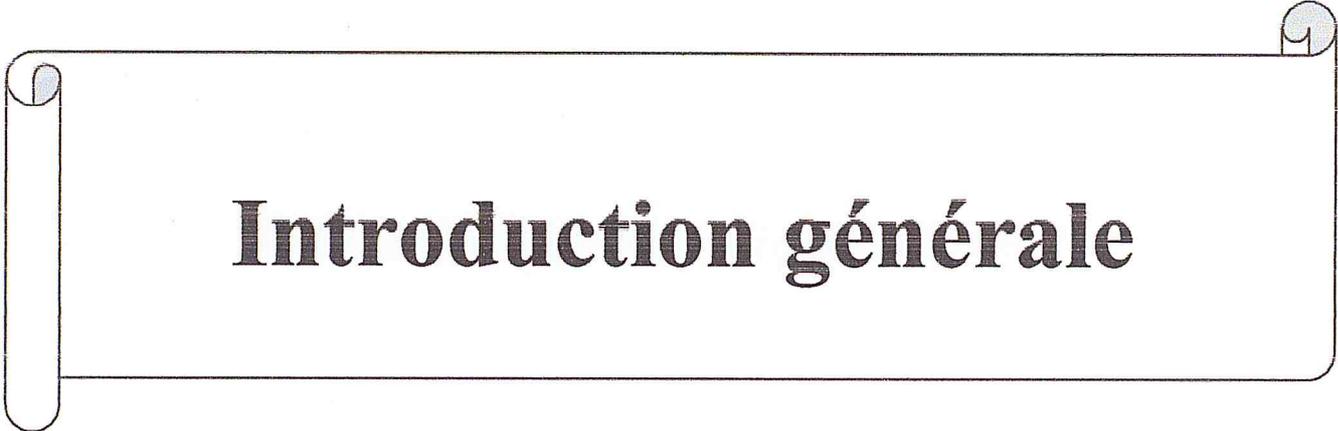
Chapitre 2 : Étude de la composition chimique de l'espèce *Globularia alypum*

| | |
|--|----|
| I. Extraction de métabolites secondaires de l'espèce <i>Globularia alypum</i> | 31 |
| I.1. Matériel végétal..... | 31 |
| I.2. Mode d'extraction..... | 31 |
| I.3. Détermination de rendement d'extraction..... | 33 |
| I.4. Criblage phytochimique..... | 34 |
| I.5. Dosage des polyphénols totaux..... | 36 |
| I.5.1. Principe..... | 36 |
| I.5.2. Protocole expérimentale..... | 36 |
| I.6. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)..... | 39 |
| I.6.a. Définition et principe de la CCM..... | 39 |
| I.6.b. Chromatographie sur couche mince des composés phénolique de nos extraits de plante..... | 39 |
| I.7. Analyse par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)..... | 41 |
| I.7.a. Généralité..... | 41 |
| II. Extraction et analyse de l'huile essentielle..... | 41 |
| II.1. Extraction de l'huile essentielle..... | 41 |
| II.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse.... | 42 |

Chapitre 3 : Étude de l'activité biologique de l'espèce *Globularia alypum*

| | |
|--|----|
| I. Étude de l'activité antioxydante de l'espèce <i>Globularia alypum</i> | 46 |
| I.1. Définition..... | 46 |
| I.2. Principe du test de DPPH..... | 46 |
| I.3. Protocole expérimental..... | 47 |
| II. Étude de l'activité antimicrobienne de l'espèce <i>Globularia alypum</i> | 51 |
| II.1. Principe..... | 51 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| II.2. Protocole expérimental..... | 51 |
| Conclusion générale..... | 58 |
| Références bibliographiques..... | 59 |
| Annexe..... | 67 |

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and rounded ends, containing the title text. The scroll is positioned in the middle of the page.

Introduction générale

Introduction générale

A travers les âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base tels que, la nourriture, l'abri, les vêtements mais aussi également ses besoins médicaux. Les plantes possèdent des vertus thérapeutiques, leurs utilisations pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme sont très anciennes et traditionnelles [1]. L'utilisation des plantes en thérapeutique connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public. Il est possible d'utiliser les plantes telles quelles ou leurs formes extractives [2].

Aujourd'hui, la recherche de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle repose sur la qualité des plantes médicinales et sur les études ethnobotaniques qui permettent de réaliser des inventaires de plantes d'une région, en déterminant leur qualité par des études phytochimiques et pharmacologiques. De ce fait, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays [3].

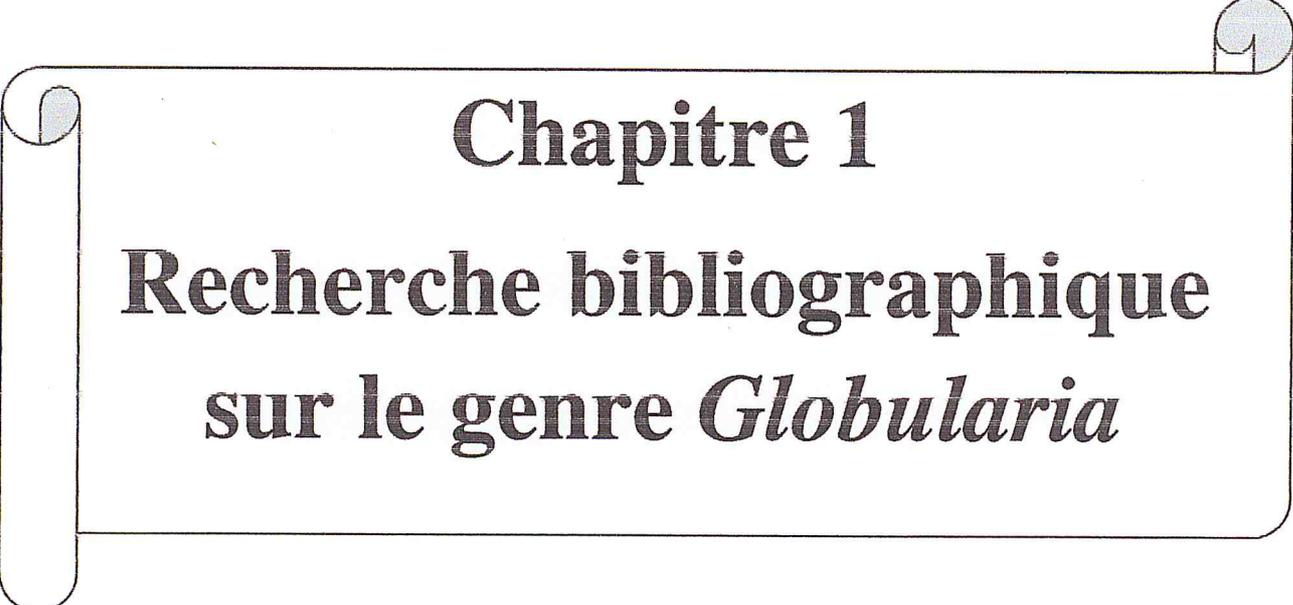
L'Algérie, pays connu pour ses ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3 000 espèces de plantes dont 15% endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques [4].

Notre travail englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction, le screening phytochimique, quantification des composés phénoliques et la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Globularia alypum* appartient à la famille de *Globulariaceae*. Le second aspect est l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne de cette espèce.

Il est donc subdivisé en trois chapitres:

- Le premier chapitre est une synthèse bibliographique consacrée à une étude botanique et phytochimiques générale de la famille et du genre de l'espèce étudiée (*Globularia alypum*).
- Le second chapitre contient l'extraction de métabolites secondaires, puis à l'extraction et la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Globularia alypum*.
- Le troisième chapitre est consacré à l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'espèce étudiée.

Enfin, ce travail est achevé par une conclusion générale.



Chapitre 1
Recherche bibliographique
sur le genre *Globularia*

1. Présentation botanique et géographique de la famille *Globulariaceae*

La famille des *Globulariaceae* sont des arbrisseaux, des sous-arbrisseaux, ou des herbes vivaces. Les feuilles alternes, simples, entières, agrégées à la base des rameaux. Les fleurs, irrégulières, agrégées en tête sur un réceptacle convexe. Le calyce herbacé, monosépale, à tube tétragone après la floraison, à gorge ordinairement fermée par des poils. La corolle monopétale, insérée sur le réceptacle, à tube cylindrique, à limbe unilabié, ou bilabié. Les 4 étamines, insérées au sommet du tube de la corolle, alternes avec ses lobes, la 5^e manquant entre les lobes de la lèvre supérieurs. L'ovaire libre, uniloculaire, muni à sa base d'un nectaire hypogyne, minime, rarement réduit à un gland antérieur, quelquefois nul. L'ovule unique. Le style terminal, simple et le stigmate indivis, ou courtement bilobé [5].

La famille *Globulariaceae* se compose de 10 genres et 300 espèces réparties en Europe, en Asie occidentale, en Afrique et à Madagascar. Les plus grands genres sont *Selago* (180 espèces), *Habenstretia* (40 espèces) et *Globularia* (25 espèces).

Sur le plan économique, la famille n'a que peu de valeur. Certaines espèces de *Globularia* sont cultivées comme des plantes de jardin de roche [6].

2. Présentation botanique du genre *Globularia*

Les plantes du genre *Globularia* sont des herbes vivaces ou des sous arbrisseaux à feuilles persistantes, habitant les régions chaudes et tempérées de l'Europe, et particulièrement le bassin de la Méditerranée. Les espèces herbacées ont des feuilles radicales, pétiolées, plus longues que les caulinaires. Les feuilles sont entières, rarement dentées, en général obovées ou spatulées, alternes, sans stipules. Les fleurs sont groupées en capitules plus souvent terminaux, quelquefois axillaires. Le calice est à cinq divisions à peu près égales, rarement disposées en deux lèvres. La corolle est bleue, tubuleuse, à limbe généralement bilabié. Les étamines sont au nombre de quatre. L'ovaire uniloculaire contient un seul ovule. Le style est filiforme, le stigmate quelquefois simple, plus souvent émarginé bilobé. Le fruit est un caryopse ovoïde, enveloppé par le calice persistant, et contenant une seule graine renversée. L'embryon est droit, la radicule est supérieure, aussi longue que les cotylédons, qui sont épais et plans convexes [7].

3. Répartition géographique

Les plantes du genre *Globularia* se distribuent dans la région, méditerranéenne et dans le sud de l'Europe avec un nombre d'espèces endémiques localisés au Cap-Vert, aux îles Canaries, la Grèce, les Baléares, l'Italie et la Turquie [8].

Tableau N° 1 : Répartitions géographiques de quelques espèces du genre *Globularia*.

| <i>Espèces</i> | <i>Répartitions géographiques</i> | <i>Références</i> |
|---|---|-------------------|
| <i>G. alypum</i> | Dans les régions méditerranéennes, l'Europe et l'Afrique du Nord. | [9] |
| <i>G. arabica (Pomel)</i> | En Algérie dans le Hoggar et en Maroc. | [10] |
| <i>G. greuteri et G. liouvillei</i> | Dans le Maroc | [11] |
| <i>G. gracilis</i> | Aux Pyrénées à la frontière entre la France et l'Espagne. | [11] |
| <i>G. anatolica</i> <i>G. sintenisii</i> | En Turquie | [12] |
| <i>G. meridionalis, G. bisnagarica, G. cordifolia et G. incanescens</i> | En Italie | [13] |
| <i>G. aphyllanthes</i> | Nord-ouest de la Turquie vers l'Europe centrale méridionale | [14] |

4. Usages traditionnels

Les plantes du genre *Globularia* ont été utilisées en médecine traditionnelle en tant qu'agent, laxatives, diurétiques, toniques et il également dans le traitement des hémorroïdes [15].

La décoction est utilisée comme dépuratif. On l'absorbe aussi pour la fièvre ; en bains de bouche, elle traiterait les aphtes et le muguet et, en lotions ou compresses, les mycoses dermiques et celles du cuir chevelu [16].

5. Propriétés biologiques

Les activités anti-hypertensives et anti-diabétiques ont été mises en évidence par plusieurs travaux [17-19].

L'infusion de feuilles, à raison de 0,7g/Kg, produit, un effet hypoglycémiant significatif [20]. Certains glycosides d'iridoïdes, particulièrement les globularines sont connus pour leur activité anti-inflammatoire par voie locale [21].

Les extraits de parties aériennes réduisent de manière considérable les contractions induites par l'histamine et la sérotonine [22].

Les extraits de tiges feuillées ont manifesté des effets anti-oxydants significatifs et les auteurs suggèrent le rôle possible des polyphénols dans cette activité [23]. D'autres travaux ont montré l'activité anti-leucémique et anti-cancéreuse des plantes de ce genre [24, 25].

Tableau N° 2 : Usages et propriétés de quelques espèces du genre *Globularia*.

| Plantes | Usages et Propriétés | Références |
|------------------------|---|------------|
| <i>G. alypum</i> | La plante est utilisée en tant que laxative, tonique, hypoglycémique, purgative et sudorifique. Et également utilisé pour traiter, des maladies cardio-vasculaires, dans le traitement du diabète et dans les maladies rénales. | [26, 27] |
| <i>G. arabica</i> | Effets anti-microbiennes et anti-tumorigéniques. | [8] |
| <i>G. trichosantha</i> | La plante est utilisée pour le traitement de l'hémorroïde. | [28] |
| <i>G. meridionalis</i> | Effets anti-oxydants et anti-cholinestérases. | [29] |

6. Travaux antérieures sur le genre *Globularia*

La majorité des études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces dans le genre *Globularia*, montrent la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites secondaires incluant en particulier : des iridoïdes, des bisiridoïdes, des flavonoïdes et des phényléthanoïdes glycosides [23, 30-33].

Dans cette partie de ce chapitre nous nous intéressons à étudier les principaux métabolites secondaires isolés dans le genre *Globularia*.

6.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés. Ils présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) [34].

Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales [35]. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) [36].

La synthèse des polyphénols suit généralement deux voies: la voie de shikimate et celle du phénylpropanoïde.

En plus de la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte : (les flavonoïdes) est considérablement accrue [37].

6.1.a. Les flavonoïdes

6.1.a.1. Généralité

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante. Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques, dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance [38]. Actuellement, environ 4000 composés flavoniques sont connus et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane.

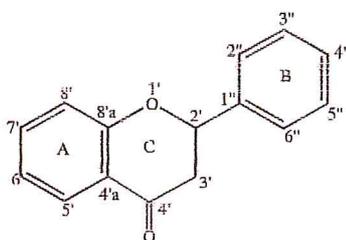


Figure 1: Structure générale des flavonoïdes.

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C. En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones, aurones (Figure 2) [38].

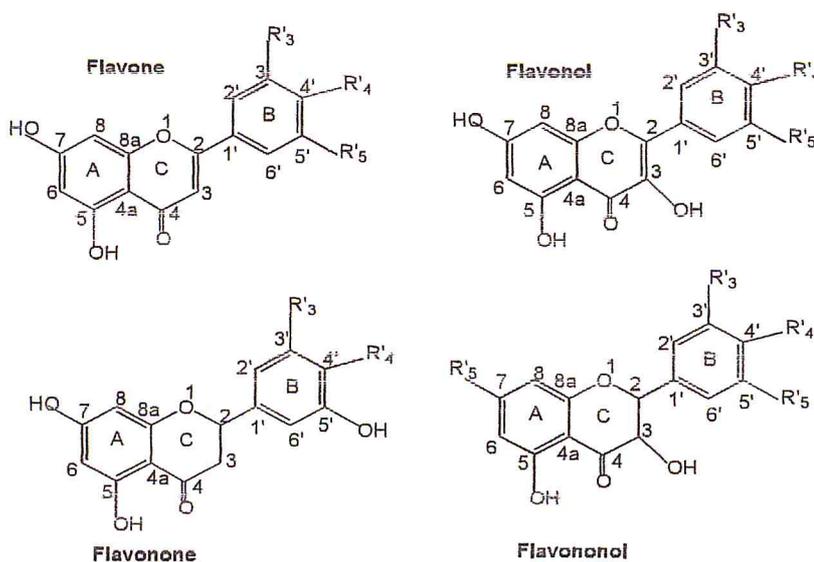


Figure 2 : Structure de quelques classes des flavonoïdes.

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-spasmodiques, anti-tumorales, anti-agrégation plaquettaire, anti-allergiques, hypocholestérolémiantes, anti-inflammatoires, anti-hypertensives et anti-microbiennes [39, 40].

Malgré leur diversité structurale importante, tous les flavonoïdes semblent avoir une voie biosynthétique commune. L'enzyme clé pour la formation du squelette flavonoïque est la chalcone synthase (CHS) qui catalyse l'étape de condensation de trois unités acétate à partir de malonyl-CoA avec la 4 coumaroyl-CoA pour donner l'intermédiaire en C15, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydrochalcone [41].

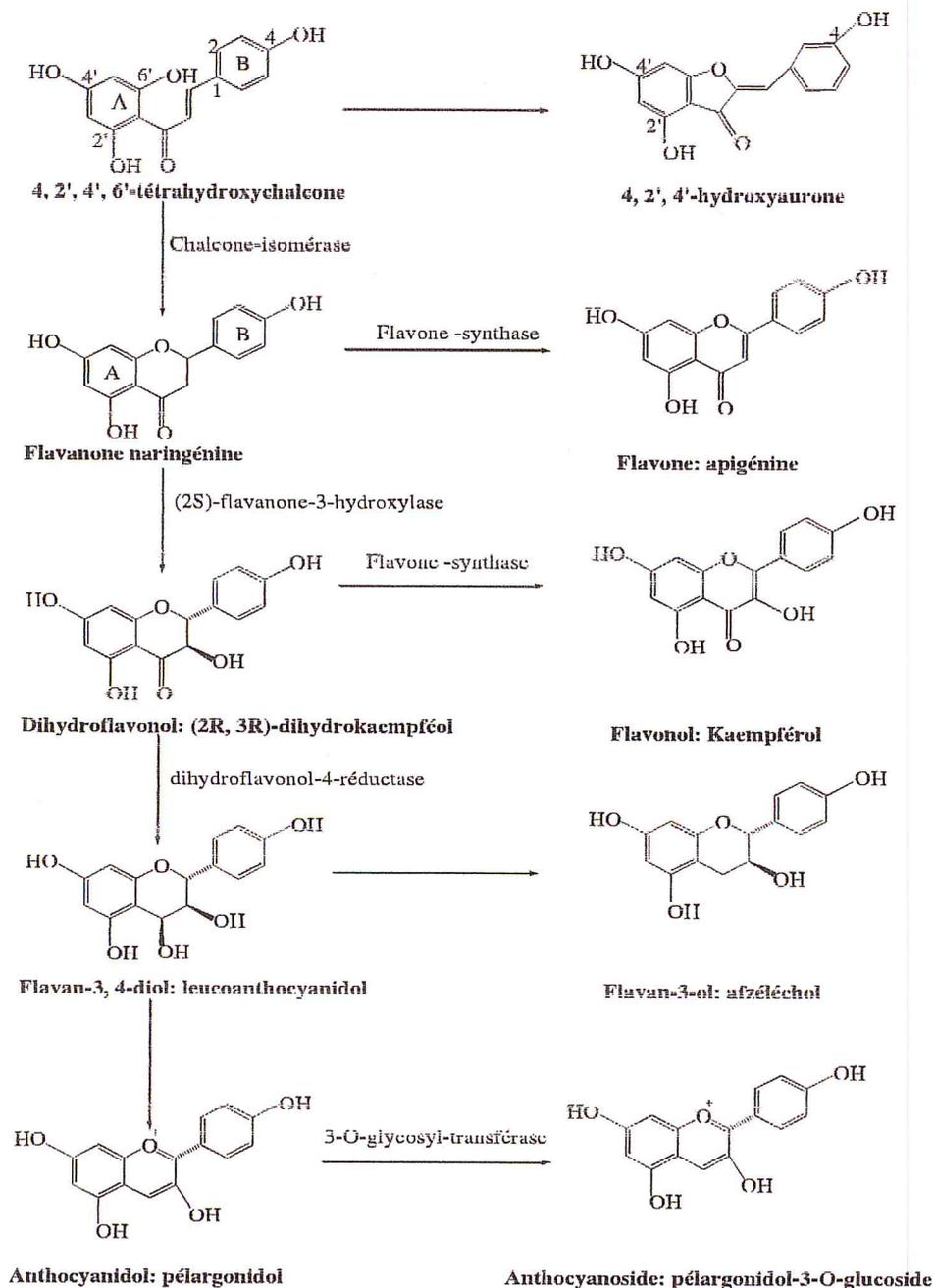


Figure 3 : Schéma illustrant la biosynthèse des flavonoïdes [42].

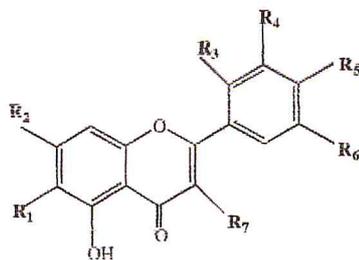
6.1.a.2. Les flavonoïdes isolés du genre *Globularia*

Le genre *Globularia* contient un grand nombre de flavonoïdes, étant principalement présents sous forme de flavones, flavonols et leurs glucosides. Les flavones 6-hydroxylutéoline sont présents dans toutes les espèces du genre qu'ils ont examinées [43]. En outre, d'autres dérivés flavonoïdes, tels que l'apigénine, Lutéoline et quercétine, ont été rapportés dans des espèces de *Globularia* [23]. Et également un nouveau glycoside de flavone appelé, aphyllanthoside, a été isolé dans des parties aériennes de *Globularia l'aphyllanthes* [44].

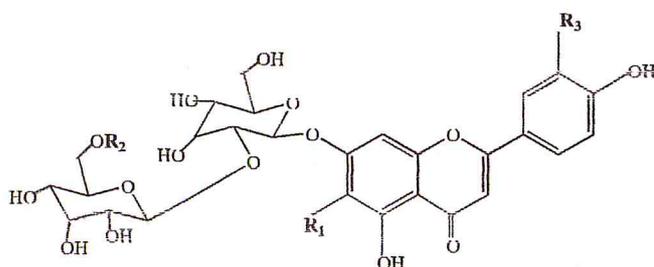
Tableau N° 3 : Quelques flavonoïdes isolés du genre *Globularia*.

| Espèce | Nom de composé isolé et N° de structure | Réf. |
|------------------------|--|---------------------|
| <i>G. incanescens</i> | 6-hydroxylutéoline <u>1</u> | [43] |
| | Lutéoline <u>2</u> | |
| | Quercétine <u>3</u> | |
| <i>G. cordifolia</i> | Chrysoeriol-7-O-β-D-allopyranosyl-1→2-β-D-glucopyranoside <u>4</u> | [45] |
| | Stachyposide <u>5</u> | |
| | 6-hydroxylutéoline <u>1</u> | [43] |
| | 6-hydroxyapigénine (scutellareine) <u>6</u> | |
| | Scutellareine-6,4'-diméthyl éther (pectolinarigénine) <u>7</u> | |
| | 6-hydroxylutéoline 6, 4'-diméthyl éther <u>8</u> | |
| | 6-hydroxylutéoline-7-O-glucoside <u>9</u> | [46] |
| | Lutéoline-7-O-glucoside <u>10</u> | |
| | 6-hydroxychrysoeriol-7-O-allopyranosyl <u>11</u> | |
| | Diméthoxycentaureidine-7-O-hexosylglucoside <u>12</u> | |
| | | Apigénine <u>13</u> |
| <i>G. nudicaulis</i> | 6-hydroxylutéoline <u>1</u> | [43] |
| | Lutéoline <u>2</u> | |
| <i>G. aphyllanthes</i> | 6-hydroxylutéoline <u>1</u> | [43] |
| | 6-hydroxylutéoline-7-O-[6'''-benzoyl-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranoside (Aphyllanthoside) <u>14</u> | [44] |
| | 6-hydroxylutéoline-7-O-[6'''-(E)-caffcoyl-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranoside <u>15</u> | |
| | Isoquercitrine <u>16</u> | |
| <i>G. vulgaris</i> | 6-hydroxylutéoline <u>1</u> | [43] |
| <i>G. dumulosa</i> | Pectolinarigenine-7-O-β-D-glucopyranoside <u>17</u> | [47] |
| | Nepetine-7-O-β-D-glucopyranoside <u>18</u> | |
| | Diméthoxycentaureidine-7-O-β-D-glucopyranoside <u>12</u> | |
| <i>G. orientalis</i> | 6-hydroxylutéoline <u>1</u> | [43] |
| | Lutéoline <u>2</u> | |
| | Scutellareine <u>6</u> | |
| <i>G. trichosantha</i> | 6-hydroxylutéoline <u>1</u> | [43] |

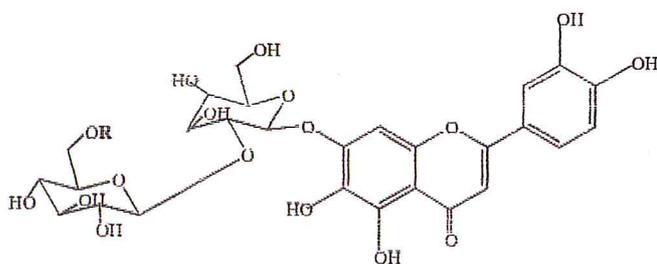
| | | |
|------------------------|---|---|
| <i>G. meridionalis</i> | Pectolarigenine-7-O-hexosylglucoside <u>17</u> | [29] |
| | Apigénine-7-O- β -glucoside <u>19</u> | |
| | Lutéoline <u>2</u> | |
| | 6-hydroxylutéoline-7-O-glucoside <u>9</u> | |
| | [46] | Lutéoline-7-O-glucoside <u>10</u> |
| | | 6-hydroxychrysoeriol-7-O-glucoside <u>20</u> |
| | | 6-hydroxychrysoeriol-7-O-allopyranosyl <u>11</u> |
| | | Diméthoxycentaureidine-7-O-hexosylglucoside <u>12</u> |
| | | Apigénine <u>13</u> |
| | | Pectolarigenine-7-O-hexosylglucoside <u>17</u> |
| <i>G. salicina</i> | 6-hydroxylutéoline <u>1</u> | [43] |
| | Scutellareine <u>6</u> | |
| <i>G. punctata</i> | 6-hydroxylutéoline-7-O-diglucoside <u>21</u> | [46] |
| | 6-hydroxylutéoline-7-O-glucoside <u>9</u> | |
| | Isoquercitrine <u>16</u> | |
| | Lutéoline-7-O-glucoside <u>10</u> | |
| | 6-hydroxylutéoline-7-O-(6'''-O-caffeoyl)-sophoroside <u>22</u> | |
| | 6-hydroxylutéoline-7-O-(6'''-O-p-coumaroyl)-sophoroside <u>23</u> | |
| | Aphyllanthoside <u>14</u> | |
| | Lutéoline <u>2</u> | |
| | Apigénine <u>13</u> | |
| <i>G. spinosa</i> | 6-hydroxylutéoline <u>1</u> | [43] |
| | Scutellareine <u>6</u> | |
| <i>G. elongata</i> | Apigénine <u>13</u> | [48] |
| | Lutéoline <u>2</u> | |
| | 6-hydroxylutéoline <u>1</u> | |
| | 6-hydroxylutéoline-7-sophoroside <u>24</u> | |
| | 6-hydroxylutéoline-7-O-(6'''-O-caffeoyl)-sophoroside <u>22</u> | |
| | 6-hydroxylutéoline-7-O-(6'''-O-p-coumaroyl)-sophoroside <u>23</u> | |
| | 6-hydroxylutéoline-7-O-diglucoside <u>21</u> | |



| Flavonoïdes | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ | R ₇ |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <u>1</u> | OH | OH | H | OH | OH | H | H |
| <u>2</u> | H | OH | H | OH | OH | H | H |
| <u>3</u> | H | OH | H | OH | OH | H | OH |
| <u>6</u> | OH | OH | H | H | OH | H | H |
| <u>7</u> | OMé | OH | H | H | OMé | H | H |
| <u>8</u> | OMé | OH | H | OH | OMé | H | H |
| <u>9</u> | OH | OGlc | H | OH | OH | H | H |
| <u>10</u> | H | OGlc | H | H | OH | OH | H |
| <u>11</u> | OH | O-all | H | OMé | OH | H | H |
| <u>12</u> | OMé | OGlc | H | OMé | OH | H | H |
| <u>13</u> | H | OH | H | H | OH | H | H |
| <u>16</u> | H | OH | H | OH | OH | H | OGlc |
| <u>17</u> | OMé | OGlc | H | H | OMé | H | H |
| <u>18</u> | OMé | OGlc | H | H | OH | OH | H |
| <u>19</u> | H | OGlc | H | H | OH | H | H |
| <u>20</u> | OH | OGlc | H | OMé | OH | H | H |
| <u>21</u> | OH | O-di-Glc | H | OH | OH | H | H |



| Flavonoïdes | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|-------------|----------------|----------------|----------------|
| <u>4</u> | H | H | OMé |
| <u>5</u> | H | Ac | OMé |
| <u>14</u> | OH | Benzoyl | OH |
| <u>15</u> | OH | (E)-caffeoyl | OH |



| Flavonoïdes | R |
|-------------|-------------|
| <u>22</u> | Benzoyl |
| <u>23</u> | P-coumaroyl |
| <u>24</u> | H |

Figure 4 : Structure de quelques flavonoïdes isolés du genre *Globularia*.

6.1.b. Les phényléthanoïdes glycosides.

6.1.b.1. Généralité

Les phényléthanoïdes glycosides (PhGs) sont une classe de composés hydrosolubles largement distribués dans les médicaments traditionnels, ainsi que d'autres plantes médicinales [49]. Comme leurs noms le suggèrent, les PhGs sont caractérisés par un fragment d'alcool phényléthylique (C6-C2) attaché à un β -glucopyranose / β -allopyranose par une liaison glycosidique.

Les structures de noyau sont souvent abondamment décorées avec des substituants tels que des acides aromatiques (par exemple, l'acide caféique, l'acide coumarique, l'acide cinnamique, l'acide férulique et l'acide isoférulique) et divers saccharides (par exemple, rhamnose, xylose, apiose, glucose, lyxose, allose et arabinose) par des liaisons esters ou glycosidiques, respectivement [50]. Ces derniers, sont largement distribués dans les familles : *Acanthaceae*, *Asteraceae*, *Berberidaceae*, *Buddejaceae*, *Crassulaceae*, *Gesneriaceae*, *Lamiaceae*, *Magnoliaceae*, *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Plantaginaceae*, *Scrophulariaceae* et *Verbenaceae* [50]. Ils ont été détectés dans les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits et les graines sans sélectivité des organes, tandis que leurs concentrations dans chaque organe peuvent varier beaucoup [49]. Et également, sont dérivés des herbes médicinales traditionnellement employées pour traiter des désordres de foie, la fièvre et l'asthme, qui ont attiré des chimistes pour extraire ces composés et pour découvrir leurs applications cliniques potentielles.

De nos jours, les phényléthanoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical, où on leur reconnaît des activités : anti-bactériennes, anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-tumorales, neuroprotectives et hepatoprotectives [51-54].

Les phényléthanoïdes glycosides sont dérivées de l'acide hydroxycinnamique. L'estérification enzymatique d'un dérivé phényléthanol glycosylé par un dérivé de l'acide cinnamique (férulique, caféique, p-coumarique) conduit au phényléthanoïde glycoside correspondant (Figure 5) [55].

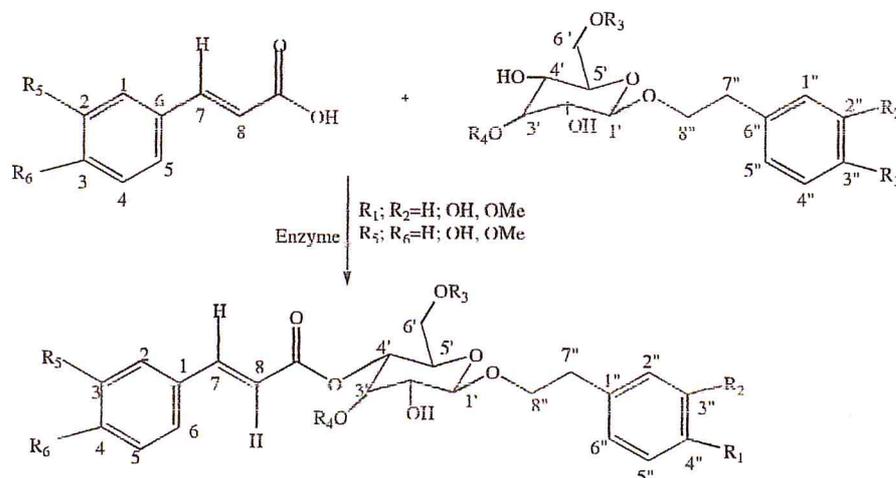


Figure 5: Formation de phényléthanoïdes.

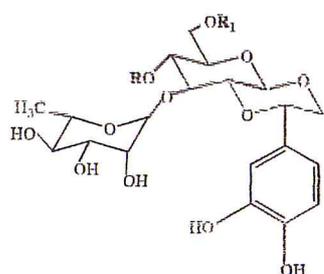
6.1.b.2. Les phényléthanoïdes glycosides isolés du genre *Globularia*

D'après les études bibliographiques, les phényléthanoïdes glycosides sont un caractère taxonomique important du genre *Globularia*. Parmi eux sont : l'acteoside, l'isoacteoside, l'arenarioside, le decafféoylverbascoside, le leucosceptoside A, le crenatoside, l'isocrenatoside, et les trichosanthosides A [32]. Et également un nouveau phényléthanoïde glycoside appelé Crenatoside (Oraposide) a été isolé dans des parties aériennes de *Globularia trichosantha* [30, 31]. Dans cette partie nous avons recensé tous les phényléthanoïdes es isolés de ce genre, ils sont dressés dans le tableau 4.

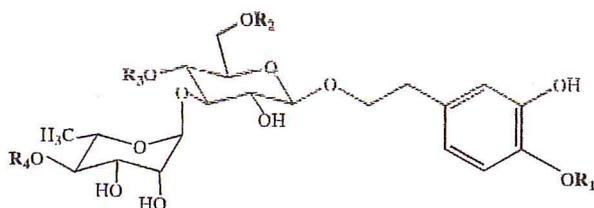
Tableau N° 4 : Quelques phényléthanoïdes isolés du genre *Globularia*.

| Espèce | Nom de composé isolé et N° de structure | Réf. |
|--|--|----------|
| <i>G. trichosantha</i> | Crenatoside (Oraposide) <u>25</u> | [30, 31] |
| | Trichosanthoside A <u>26</u> | |
| | Rossicaside A <u>27</u> | |
| | Verbascoside (Acteoside) <u>28</u> | |
| | Isoverbascoside (isoacteoside) <u>29</u> | |
| | Trichosanthoside B <u>30</u> | |
| | Verbascoside (Acteoside) <u>28</u> | |
| | Isoverbascoside (isoacteoside) <u>29</u> | |
| <i>G. meridionalis</i> | Decaffeoyl-verbascoside <u>31</u> | [46] |
| | Verbascoside (Acteoside) <u>28</u> | |
| | Rossicaside A <u>27</u> | |
| | Isoverbascoside (isoacteoside) <u>29</u> | |
| | Leucosceptoside A <u>32</u> | |
| | Plantainoside C <u>33</u> | |
| | Globusintenoside <u>34</u> | |
| | Acteoside <u>28</u> | |
| Isoverbascoside (isoacteoside) <u>29</u> | | |
| <i>G. dumulosa</i> | Verbascoside (Acteoside) <u>28</u> | [47] |
| | Decaffeoyl-verbascoside <u>31</u> | |
| | Leucosceptoside A <u>32</u> | |
| <i>G. aphyllanthes</i> | Verbascoside (Acteoside) <u>28</u> | [44] |
| | Rossicaside A <u>27</u> | |
| | Trichosanthoside A <u>26</u> | |
| <i>G. orientalis</i> | Verbascoside (Acteoside) <u>28</u> | [32] |
| <i>G. punctata</i> | Rossicaside A <u>27</u> | [46] |
| | Verbascoside (Acteoside) <u>28</u> | |
| | Trichosanthoside B <u>30</u> | |
| | Isoverbascoside <u>29</u> | |
| | Trichosanthoside A <u>26</u> | |
| | Globusintenoside <u>34</u> | |

| | | |
|--------------------------|--|------|
| <i>G. cordifolia</i> | Decaffeoyl-verbascoside <u>31</u> | [46] |
| | Verbascoside (Acteoside) <u>28</u> | |
| | Rossicaside A <u>27</u> | |
| | Isoverbascoside (isoacteoside) <u>29</u> | |
| | Globusintenoside <u>34</u> | |
| | Verbascoside (Acteoside) <u>28</u> | |
| | Isoverbascoside (isoacteoside) <u>29</u> | [45] |
| | Leucosceptoside A <u>32</u> | |
| | Martynoside <u>35</u> | |
| | Rossicaside A <u>27</u> | |
| <i>G. davisiana</i> | Verbascoside (Acteoside) <u>28</u> | [33] |
| | Isoverbascoside (isoacteoside) <u>29</u> | |
| | Leucosceptoside A <u>32</u> | |
| <i>G. sintenisii</i> | Globusintenoside <u>34</u> | [57] |
| | 3''-O-méthylcrenatoside <u>36</u> | |
| | Verbascoside (Acteoside) <u>28</u> | |
| | Isoverbascoside (isoacteoside) <u>29</u> | |
| | Leucosceptoside A <u>32</u> | |
| | Plantainoside C <u>33</u> | |
| | Martynoside <u>35</u> | |
| Isocrenatoside <u>37</u> | | |



| Phényléthanoïdes | R | R ₁ |
|------------------|----------|----------------|
| <u>25</u> | Caffeyol | H |
| <u>37</u> | H | Caffeyol |



| Phényléthanoïdes | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| <u>26</u> | H | H | Caffeyol | β-Xyl |
| <u>27</u> | H | H | Caffeyol | β-Glc |
| <u>28</u> | H | H | Caffeyol | H |
| <u>29</u> | H | Trans-caffeyol | H | H |
| <u>30</u> | H | Glu | Caffeyol | Glu |
| <u>31</u> | H | H | H | H |
| <u>32</u> | H | H | Trans-caffeyol | H |
| <u>33</u> | H | Feruloyl | H | H |
| <u>35</u> | CH ₃ | H | Trans-feruloyl | H |

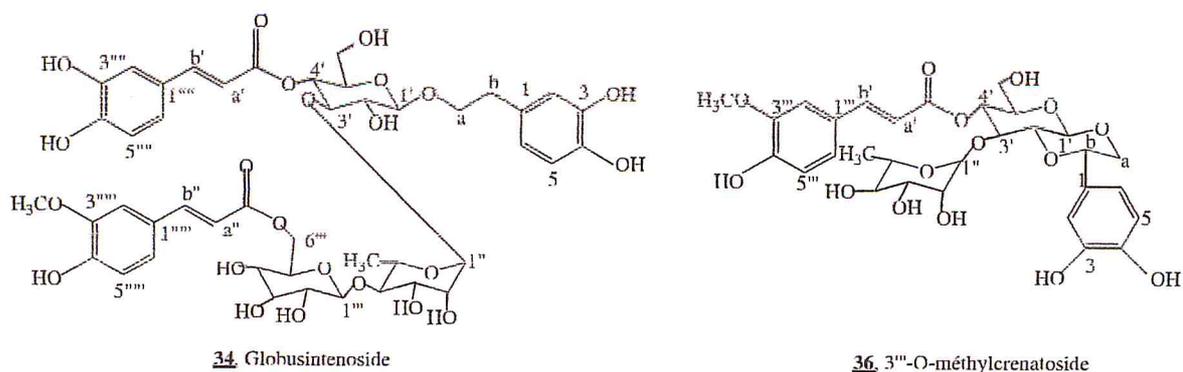


Figure 6 : Structure de quelques phényléthanoïdes isolés du genre *Globularia*.

6.2. Les iridoïdes

6.2.a. Généralité

Les iridoïdes sont un groupe de composés naturels appartenant à la grande classe des terpénoïdes [58]. Ce sont des monoterpènes caractérisés par un squelette cyclopentane(C) pyranique à jonction *cis*, partiellement hydrogéné [59].

Ils sont définis par une structure commune, en l'occurrence le noyau iridane de nature cyclopentapyranique *cis*-2-oxabicyclo [4, 3, O]-nonane) [42].

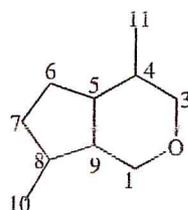


Figure 7 : Structure du squelette iridane.

Bien qu'ils aient été premièrement isolés chez les fourmis, les iridoïdes sont rares chez les insectes, mais sont particulièrement répandus dans le règne végétal. Ils sont présents uniquement dans les dicotylédones, en particulier chez les Asteridae [60] tel que : Dipsacales Gentianales, Lamiales, Plantaginales, Rubiales et les Scrophulariales, ce qui en fait des marqueurs chimiotaxonomiques intéressants [61].

Les iridoïdes qui constituent la famille la plus nombreuse des dérivés monoterpéniques à squelette cyclopentanoïdes, peuvent être divisés en cinq groupes [62] : iridoïdes simples ou non glycosylés, iridoïdes glycosylés, sécoiridoïdes, bisiridoïdes et les iridoïdes lactones.

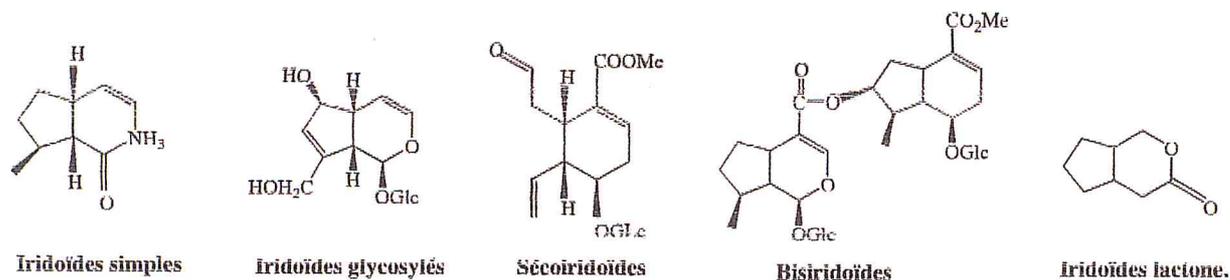


Figure 8 : Structure de quelques classes des iridoïdes.

De nos jours, les propriétés des iridoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical, ils sont utilisés pour traiter les désordres digestifs, la fièvre et soulager les douleurs des parturientes [63]. Ils possèdent des propriétés anti-microbiennes [64], anti-tumorales [65], anti-oxydantes [66], anti-allergiques [67], anti-inflammatoires, hypoglycémiques, anti-cancéreux, cholérétiques et purgatives [68].

6.2.b. Biosynthèse des iridoïdes.

Les iridoïdes, monoterpènes en C₁₀, dérivent du pyrophosphate de géranyl. Les éléments de base des terpénoïdes sont les unités de l'isoprène en C₅ sous forme d'isopentenyl pyrophosphate (IPP) et de diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) [69].

Une catalyse par l'enzyme prényl transférase, suivie d'une addition tête à queue du DMAPP à l'IPP conduit à la formation du géranyl pyrophosphate (GPP). Cette réaction qui passe par l'ionisation du DMAPP donnant le carbocation allylique correspondant [70].

La conversion de géranyl pyrophosphate (GPP) en loganine passe par différentes étapes. Dans la première étape le GPP est oxydé en 10-hydroxygéraniol. L'isomérisation de ce dernier conduit au 10-hydroxynérol. Le trialdéhyde qui en dérive subit une double addition de Michael aboutissant au précurseur iridodial, lui-même subissant par la suite une cyclisation qui conduit au lactol. L'oxydation de la fonction aldéhyde et la glucosylation de ce dernier fournit l'acide 6-déoxyloganique dont l'oxydation en C-6 permet d'obtenir l'acide loganique. L'oxydation du méthyle en C-8 de ce dernier conduit à l'hydroxyloganine.

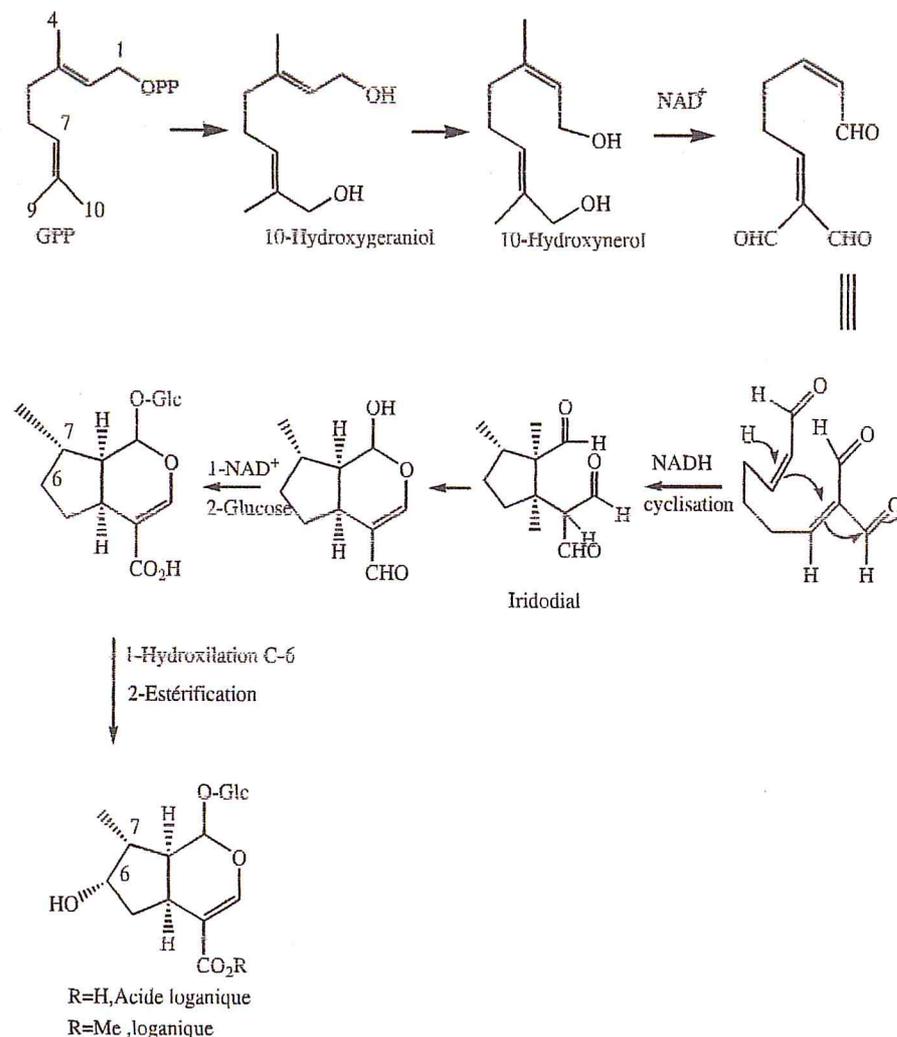


Figure 9 : La biosynthèse du loganine à partir du GPP.

6.2.c. Les iridoïdes isolés du genre *Globularia*

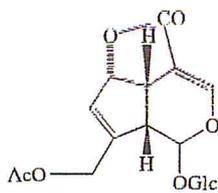
Le genre *Globularia* contient un grand nombre d'iridoïdes, étant principalement sous forme de glycosides à savoir : alpinoside, meclampyroside, aucubine et asperuloside. Davisioside, agnuside, geniposide, globularine, catalpol, 10-O-benzoylcatalpol, acide geniposidique, scandoside, deacetylalpinoside, acide asperulosidique, deacetylasperuloside, globularicisine, globularidine, globularinine et globularimine ont été également identifiés [23, 71]. Dans cette partie nous avons recensé tous les iridoïdes isolés de ce genre, ils sont dressés dans le tableau 5.

Tableau N° 5 : Quelques iridoïdes isolés du genre *Globularia*.

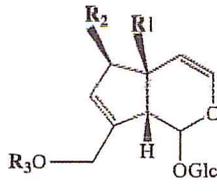
| Espèce | Nom de composé isolé et N° de structure | Références |
|--|---|------------|
| <i>G. cordifolia</i> | Asperuloside <u>38</u> | [72] |
| | Globularifoline <u>39</u> | [73] |
| | Asperuloside <u>38</u> | |
| | Aucubine <u>40</u> | |
| | Melampyroside <u>41</u> | |
| | Monomelittoside <u>42</u> | |
| | Catalpol <u>43</u> | |
| | 5- hydroxydavisioside <u>44</u> | |
| | Globuloside C <u>45</u> | [74] |
| | Aucubine <u>40</u> | |
| | Melampyroside <u>41</u> | |
| | Monomelittoside <u>42</u> | |
| | Globularifoline <u>39</u> | |
| | Alpinoside <u>46</u> | |
| | Asperuloside <u>38</u> | |
| | Monomelittoside <u>42</u> | |
| | Deacetylasperuloside <u>47</u> | [46] |
| | Deacetylalpinoside <u>48</u> | |
| | Acide Mussaenosidique <u>49</u> | |
| | Acide loganique (epi) <u>50</u> | |
| | Gardoside <u>51</u> | |
| | Acide asperulosidique <u>52</u> | |
| | Asperuloside <u>38</u> | |
| | Daphylloside <u>53</u> | |
| | Alpinoside <u>46</u> | |
| | 6'-O-Benzoylmonomelittoside <u>54</u> | |
| | 6-O-Benzoylaucubine <u>55</u> | |
| 5- hydroxydavisioside <u>44</u> | | |
| Globularifoline <u>39</u> | | |
| 6'-O-Benzoyldeacetylalpinoside <u>56</u> | | |
| <i>G. davisiana</i> | Davisioside <u>57</u> | [33] |
| | Asperuloside <u>38</u> | |
| | Alpinoside <u>46</u> | |
| | Geniposide <u>58</u> | |
| | Globularine <u>59</u> | |
| | Globularicisine <u>60</u> | |
| | Agnuside <u>61</u> | |
| | 10-O-benzoylcatalpol <u>62</u> | |
| | Lytanthosaline <u>63</u> | |
| | Melampyroside <u>41</u> | |

| | | |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>G. dumulosa</i> | 10-O-benzoylglobularigenine <u>64</u> | [47] |
| | Dumuloside <u>65</u> | |
| | Davisioside <u>57</u> | |
| | Aucubine <u>40</u> | |
| | Melampyroside <u>41</u> | |
| | Catalpol <u>43</u> | |
| | 10-O-benzoylcatalpol <u>62</u> | |
| | Alpinoside <u>46</u> | |
| | Deacetylalpinoside <u>48</u> | |
| <i>G. sinensis</i> | Sintenoside <u>66</u> | [57] |
| | Lytanthosaline <u>63</u> | |
| | Globularine <u>59</u> | |
| | Catalpol <u>43</u> | |
| <i>G. arabica</i> | Globularine <u>59</u> | [75] |
| | Globularidine <u>67</u> | |
| <i>G. nudicaulis</i> | Asperuloside <u>38</u> | [76] |
| | Aucubine <u>40</u> | |
| | Melampyroside <u>41</u> | |
| <i>G. nana</i> | Asperuloside <u>38</u> | [76] |
| | Aucubine <u>40</u> | |
| | Catalpol <u>43</u> | |
| | Globularine <u>59</u> | |
| <i>G. meridionalis</i> | Geniposide <u>58</u> | [31, 77] |
| | Melampyroside <u>41</u> | |
| | Globularifoline <u>39</u> | |
| | Asperuloside <u>38</u> | |
| | Globuloside A <u>68</u> | |
| | Globuloside B <u>69</u> | |
| | Monomelittoside <u>42</u> | |
| | [46] | Deacetylasperuloside <u>47</u> |
| | | Deacetylalpinoside <u>48</u> |
| | | Acide Mussaenosidique <u>49</u> |
| | | Acide loganique (epi) <u>50</u> |
| | | Gardoside <u>51</u> |
| | | Acide asperulosidique <u>52</u> |
| | | Asperuloside <u>38</u> |
| | | Daphylloside <u>53</u> |
| | | Alpinoside <u>46</u> |
| | | 6'-O-Benzoylmonomelittoside <u>54</u> |
| | | 6-O-Benzoylaucubine <u>55</u> |
| | | 5-hydroxydavisioside <u>44</u> |
| | | Globularifoline <u>39</u> |
| 6'-O-Benzoyldeacetylalpinoside <u>56</u> | | |

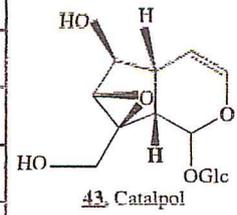
| | | |
|---------------------------------|---------------------------------|------|
| <i>G. trichosantha</i> | Deacetylalpinoside <u>48</u> | [25] |
| | Catalpol <u>43</u> | |
| | 10-O-benzoylcatalpol <u>62</u> | |
| | Aucubine <u>40</u> | |
| | Asperuloside <u>38</u> | |
| | Deacetylasperuloside <u>47</u> | |
| | Acide asperulosidique <u>52</u> | |
| | Scandoside <u>70</u> | |
| | Acide geniposidique <u>71</u> | |
| | Alpinoside <u>46</u> | |
| | Globuloside A <u>68</u> | |
| | Globuloside B <u>69</u> | |
| | Globularidine <u>67</u> | |
| <i>G. aphyllanthes</i> | Aucubine <u>40</u> | [44] |
| | Catalpol <u>43</u> | |
| | 10-O-benzoylcatalpol <u>52</u> | |
| | Globularine <u>59</u> | |
| | Asperuloside <u>38</u> | |
| | Besperuloside <u>72</u> | |
| | Acide asperulosidique <u>52</u> | |
| | Daphylloside <u>53</u> | |
| | Scandoside <u>70</u> | |
| | Alpinoside <u>46</u> | |
| | Baldaccioside <u>73</u> | |
| <i>G. punctata</i> | Catalpol <u>43</u> | [46] |
| | Scandoside <u>70</u> | |
| | Deacetylasperuloside <u>47</u> | |
| | Deacetylalpinoside <u>48</u> | |
| | Acide asperulosidique <u>52</u> | |
| | Asperuloside <u>38</u> | |
| | Daphylloside <u>53</u> | |
| | Alpinoside <u>46</u> | |
| | Globularidine <u>67</u> | |
| | Globularine <u>59</u> | |
| | Besperuloside <u>72</u> | |
| | Baldaccioside <u>73</u> | |
| | Globularinine <u>74</u> | |
| | Globularimine <u>75</u> | |
| Acide Mussaenosidique <u>49</u> | | |
| Gardoside <u>51</u> | | |
| Acide loganique (epi) <u>50</u> | | |



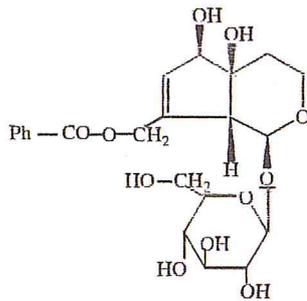
38. Asperuloside



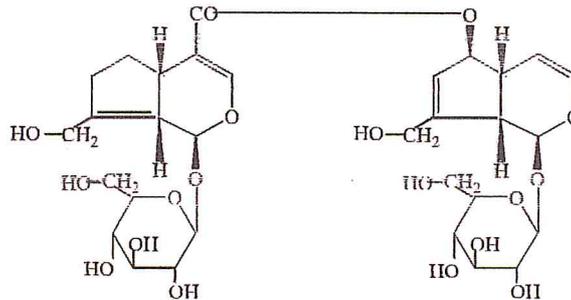
| Iridoides | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|-----------|----------------|----------------|----------------|
| 38 | OH | OH | Benzoyl |
| 40 | H | OH | H |
| 41 | H | OH | Benzoyl |
| 42 | H | OH | Ac |



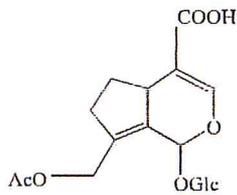
43. Catalpol



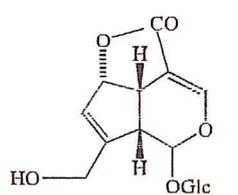
44. 5-hydroxydavisioside



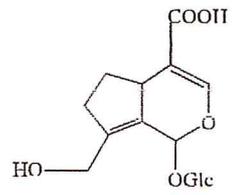
45. Globuloside C



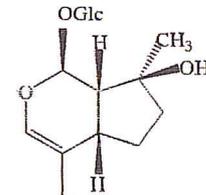
46. Alpinoside



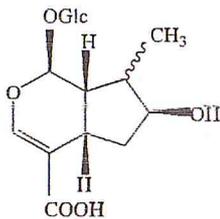
47. Deacetylasperuloside



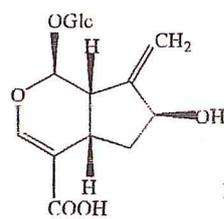
48. Deacetylalpinoside



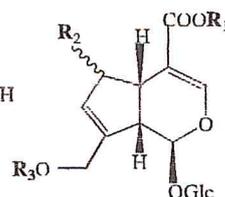
49. Acide Mussaenosidique



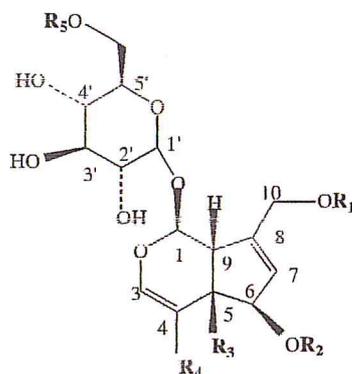
50. Acide loganique (epi)



51. Gardoside



| Iridoides | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|-----------|----------------|----------------|----------------|
| 52 | AC | OH | H |
| 53 | Mé | OH | Ac |



| iridoides | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 54 | H | H | OH | H | Benzoyl |
| 55 | H | Benzoyl | H | H | H |

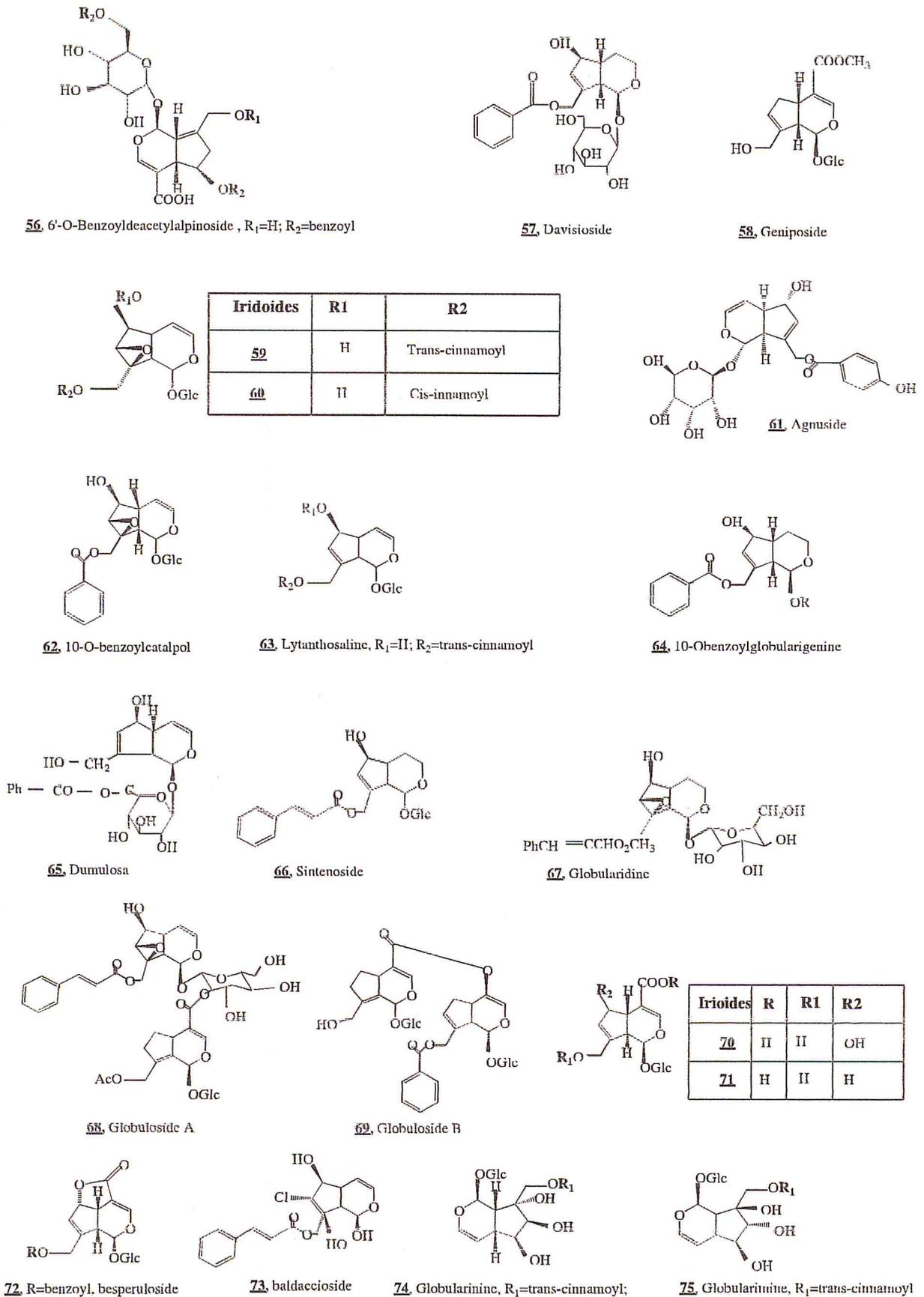


Figure 10 : Structure de quelques iridoïdes isolés du genre *Globularia*.

6. 3. Les huiles essentielles

6.3.1. Généralité

Les huiles essentielles sont très courantes dans certaines ordres, tels que les *Lamiales*, *Astérales*, *Laurales* et sont aisément remarquables par leur odeur qui peut être agréable (*lavande*, *romarin*) ou repoussante (*ballote* dite « fétide »). Elles sont liquides à température ambiante, volatiles et apolaires, ce qui permet leur obtention par hydrodistillation. Les structures de leurs constituants sont extrêmement variées pour plusieurs raisons :

- Plusieurs groupes de constituants sont rencontrés : monoterpènes (limonène), sesquiterpènes (carotol), composées aromatiques dérivés du phénylpropène (anéthole), molécules issues de la dégradation d'acides gras ou de terpènes (Figure 17).
- Monoterpènes et sesquiterpènes présentent une grande variété de squelettes (une quarantaine chez les monoterpènes).
- De nombreuses réactions interviennent pour introduire des fonctions alcool, aldéhyde, cétone, époxyde.....

Les utilisations principales des huiles essentielles sont en parfumerie. En pharmacie, leur principal intérêt est leur pouvoir antiseptique, qui peut être exploité par voie externe. D'autres propriétés, en ce qui concerne l'action anti-oxydantes, les huiles essentielles peuvent avoir une action anti-radicalaire directe, par exemple par la présence de certains composés présentant des doubles liaisons conjuguées (*chamazulène*) ou des fonctions phénoliques (*thymol*) [78].

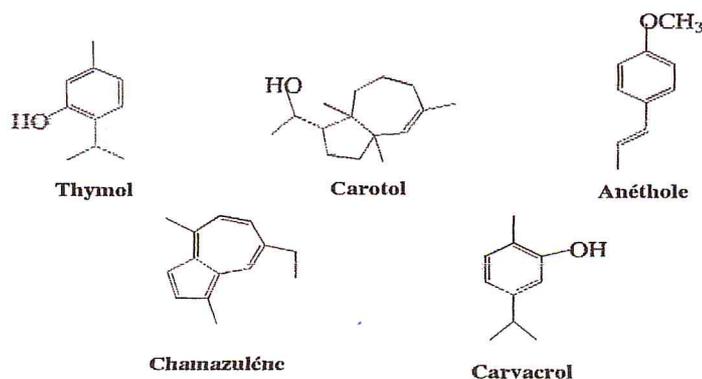


Figure 11 : Quelques exemples de constituants des huiles essentielles.

6.3.2. Les huiles essentielles du genre *Globularia*

La chimie des composés volatils dans le genre *Globularia* n'a pas été trop étudiée. Ces composés ont été isolés par hydrodistillation, des parties aériennes. L'huile essentielle obtenu a été caractérisée ensuite par l'analyse GC-FID et GC-MS. Le rendement en huile essentielles est de 0.1% [79]. Les composés majoritaires d'huiles essentielles (% \geq 3.5) des trois espèces du genre *Globularia* sont présentés dans le tableau 6.

Tableau N°6 : Composants majoritaires ($\% \geq 3.5$) d'huiles essentielles des espèces du genre *Globularia*.

| Les composés | <i>G. cordifolia</i> | | <i>G. cordifolia</i> | <i>G. meridionalis</i> | <i>G. meridionalis</i> | <i>G. punctata</i> | <i>G. punctata</i> |
|---|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|
| | Bosnie (Mostar) | Croatie (Baške Oštarije) | Croatie (Baške Oštarije) | Croatie (Baške Oštarije) | Croatie (Grobnik field) | Croatie (Grobnik field) | Croatie (vižintini) |
| Cis-hex-3-én-1-ol | 10,5 | - | - | - | - | - | - |
| Oct-1-én-3-ol | 47,0 | 12,3 | 22,6 | 9,0 | - | - | - |
| (E, E)-hepta-2,4-diéнал | 3,5 | - | - | - | - | - | - |
| 6-(1,5-diméthylhex-4-ényl)-3 méthylcyclohex-2-énone | 8,2 | 16,5 | 13,7 | 19,0 | 40,9 | 10,5 | - |
| Fukinanolide (bakkenolide A) | 7,4 | 12,5 | 16,5 | 31,6 | 9,7 | 8,3 | - |
| 2-méthylbenzofurane (2-méthylcoumarone) | - | 9,8 | - | - | 4,7 | 5,5 | - |
| 4-vinyl-2-méthoxyphénol | - | 5,3 | - | - | - | - | - |
| Cis-hex-3-énylbenzoate | - | 6,8 | - | - | - | - | - |
| 6, 10, 14-triméthylpentadécane-2-one | - | 4,7 | 3,8 | - | - | - | - |
| Phytol isomère | - | 5,2 | - | - | 9,1 | 13,0 | - |
| Acide hexadécanoïque (acide palmitique) | - | - | 4,5 | 6,1 | - | 17,6 | - |
| Acide-(Z)-Octadéc-9-énoïque (acide oleïque) | - | - | - | - | 3,9 | 8,1 | - |
| α -terpinéol | - | - | - | - | - | 3,8 | - |

7. Aperçu bibliographique sur l'espèce *Globularia alypum*

7.1. Présentation botanique et répartition géographique

Globularia alypum, appartenant à la famille de *Globulariaceae*, est un arbuste d'environ 60 cm de haut, pérenne, de feuilles coriaces, glauques de forme ovale, ses fleurs sont réunies en capitules au sommet des tiges, de couleur bleue violacée, ses fruits sont akènes [80].

On trouve cette espèce dans les régions sèches et chaudes, en Europe méridionale, en Afrique du nord, dans l'atlas saharien et dans le Hoggar [81].



Figure 12 : *Globularia alypum* L.

7.2. Classification dans la systématique botanique

L'étude de la classification botanique du genre *Globularia* a permis de déterminer la systématique suivante [82].

Embranchement : *Spermaphyta*

Sous-embranchement : *Angiospermae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Scrophulariales*

Famille : *Globulariaceae*

Genre : *Globularia*

Espèce : *Alypum* L

Noms vernaculaires [80]:

En français : *Globulaire turbith, Séné de Provence, Herbe terrible.*

En anglais : *Alypo globe daisy.*

En arabe : *Tasselgha, Ain larneb.*

7.3. Usages traditionnels et activités biologiques

L'espèce *Globularia alypum* est utilisée comme remèdes traditionnels en tant qu'agent hypoglycémique, laxative, cholagogue, stomachique, purgative et sudorifique. Cette plante est également employé dans le traitement des maladies : cardio-vasculaires, rénales [83], rhumatismes, gouttes, fièvres, typhoïdes et le diabète [19].

La décoction préparée à partir des feuilles de cette espèce peut être utilisés pour traiter les troubles digestifs, les hypertensions, les troubles cardiaques et les coliques rénales [84, 85].

7.4. Travaux antérieurs sur les métabolites secondaires de l'espèce *Globularia alypum*

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés de cette espèces tels que les iridoïdes glycosides : (globularicisine, globularine et globularidine) ; les phénylétanoïdes glycosides : (syringine) ; les lignanes glycosides : (syringaresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside et liriodendrine) ; et les terpènes ; (α -pinène, camphène, β -pinène, β -phéllandrène et caryophyllène) [86-88].

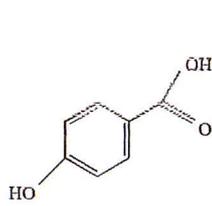
Les parties aériennes contiennent des composés phénoliques : (6'-O-coumaroyl-1'-O-[2-(3,4-dihydroxyphényl) éthyl]- β -D-glucopyranoside) ; les phénylétanoïdes glycosides : (acteoside, isoacteoside et forsythiaside) ; et les flavonoïdes glycosides : (6-hydroxylutéoline 7-O- β -D-glucopyranoside, 6-hydroxylutéoline-7-O-laminaribioside, lutéoline-7-O-sophoroside et eriodictyol 7-O-sophoroside) [23].

Les principaux constituants connus dans les feuilles sont : les essences, les résines, les stérols, les acides cinnamiques, les tannins, les mannitols et les hétérosides [89]. Dans cette partie nous avons recensé tous les métabolites secondaires de l'espèce *Globularia alypum*, ils sont dressés dans le tableau 7.

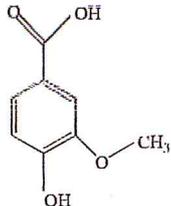
Tableau N° 7 : Les principaux métabolites secondaires isolés de l'espèce *Globularia alypum*.

| Les acides phénoliques | |
|---|------------|
| Nom de composé et N° de structure | Références |
| Acide p-hydroxybenzoïques <u>76</u> | [90] |
| acide vanillique <u>77</u> | |
| acide syringique <u>78</u> | |
| Acide caféique <u>79</u> | |
| Acide sinapique <u>80</u> | |
| acide p-coumarique <u>81</u> | |
| acide férulique <u>82</u> | |
| acide p-coumarique <u>81</u> | [91, 92] |
| Acide cinnamique <u>83</u> | |
| Les flavonoïdes | |
| Nom de composé et N° de structure | Références |
| 6-hydroxylutéoline-7-O-sophoroside <u>24</u> | [56] |
| Apigénine <u>13</u> | [48] |
| Lutéoline <u>2</u> | |
| 6-hydroxylutéoline-7-O-laminaribioside <u>84</u> | [23] |
| Eriodictyol-7-O-sophoroside <u>85</u> | |
| 6-hydroxylutéoline-7-O-glucoside <u>9</u> | |
| Lutéoline-7-O-sophoroside <u>86</u> | |
| Vicenine-2 (apigénine-6,8-di-C-glucoside) <u>87</u> | [46] |
| 6-hydroxylutéoline-7-O-diglucoside <u>21</u> | |
| 6-hydroxylutéoline-7-O-glucoside <u>9</u> | |
| Lutéoline-7-O-glucoside <u>10</u> | |
| Apigénine-7-O-glucuronide <u>88</u> | |
| Apigénine-7-O-glucoside <u>19</u> | |
| Apigénine <u>13</u> | |
| Les phényléthanoïdes | |
| Nom de composé et N° de structure | Références |
| Verbascoside (acteoside) <u>28</u> | [23] |
| Isoverbascoside (isoacteoside) <u>29</u> | |
| Forsythiaside <u>89</u> | |
| Galypumosides A <u>90</u> | [56] |
| Galypumosides B <u>91</u> | |
| Galypumosides C <u>92</u> | |
| Calceolarioside A <u>93</u> | |
| Decaffeoyl-verbascoside <u>31</u> | [46] |
| Verbascoside (acteoside) <u>28</u> | |
| Calceolarioside A <u>93</u> | |
| Rossicaside A <u>27</u> | |
| Verbascoside (acteoside) <u>28</u> | |
| Isoverbascoside (isoacteoside) <u>29</u> | |
| Leucosceptoside A <u>32</u> | |
| Globusintenoside <u>34</u> | |

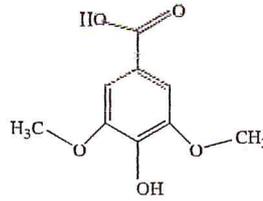
| Les iridoïdes | |
|-----------------------------------|------------|
| Nom de composé et N° de structure | Références |
| Baldaccioside <u>73</u> | [93] |
| Catalpol <u>43</u> | [56] |
| Globularicisine <u>60</u> | |
| Globularine <u>59</u> | |
| Globularidine <u>67</u> | |
| Globularinine <u>74</u> | |
| Globularimine <u>75</u> | |
| Lytanthosaline <u>63</u> | |
| Alpinoside <u>46</u> | |
| Globularicisine <u>60</u> | [94] |
| Globularidine <u>67</u> | |
| Globularimine <u>75</u> | |
| Globularinine <u>74</u> | |
| Globularine <u>59</u> | |
| Catalpol <u>43</u> | |
| Aucubine <u>40</u> | [46] |
| Catalpol <u>43</u> | |
| Deacetylalpinoside <u>48</u> | |
| Gardoside <u>51</u> | |
| Verminoside <u>94</u> | |
| Specioside <u>95</u> | |
| Alpinoside <u>46</u> | |
| Minecoside <u>96</u> | |
| Globularinine <u>74</u> | |
| Globularimine <u>75</u> | |
| Globularidine <u>67</u> | |
| Globularine <u>59</u> | |
| Baldaccioside <u>73</u> | |



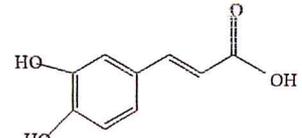
76. Acide p-hydroxybenzoïque



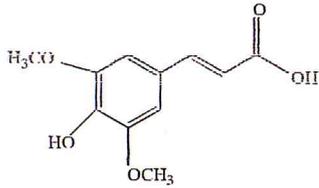
77. Acide vanillique



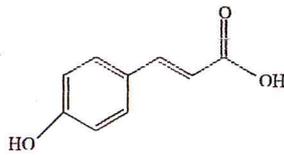
78. Acide syringique



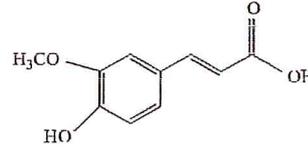
79. Acide caféique



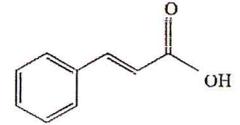
80. Acide sinapique



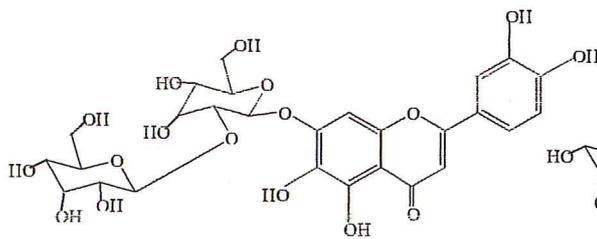
81. Acide p-coumarique



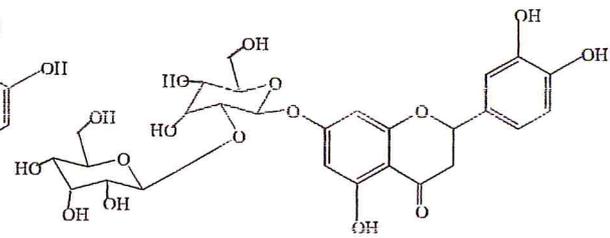
82. Acide férulique



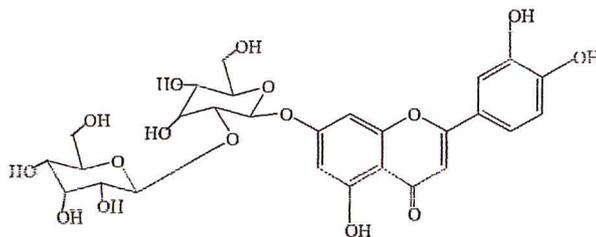
83. Acide cinnamique



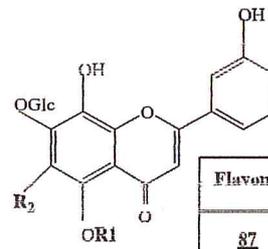
84. 6-hydroxylutéoline-7-O-laminaribioside



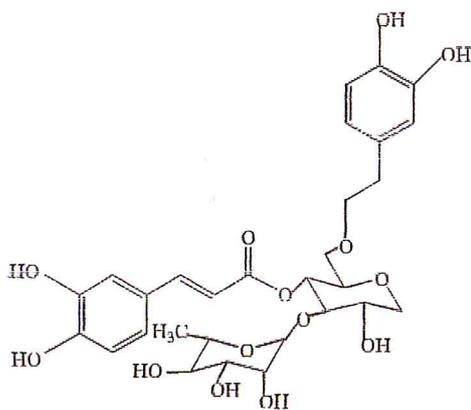
85. Eriodictyol-7-O-sophoroside



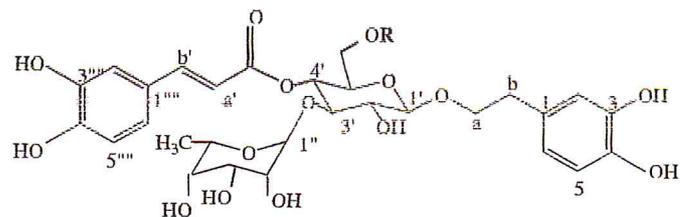
86. Lutéoline-7-O-sophoroside



| Flavonoïdes | R ₁ | R ₂ |
|-------------|----------------|----------------|
| 87 | Glc | OH |
| 88 | OH | H |



89. Forsythiaside



| Phényléthanoides | R |
|------------------|--------------------|
| 90 | R= (E)-p-coumaroyl |
| 91 | R= (E)-feruloyl |

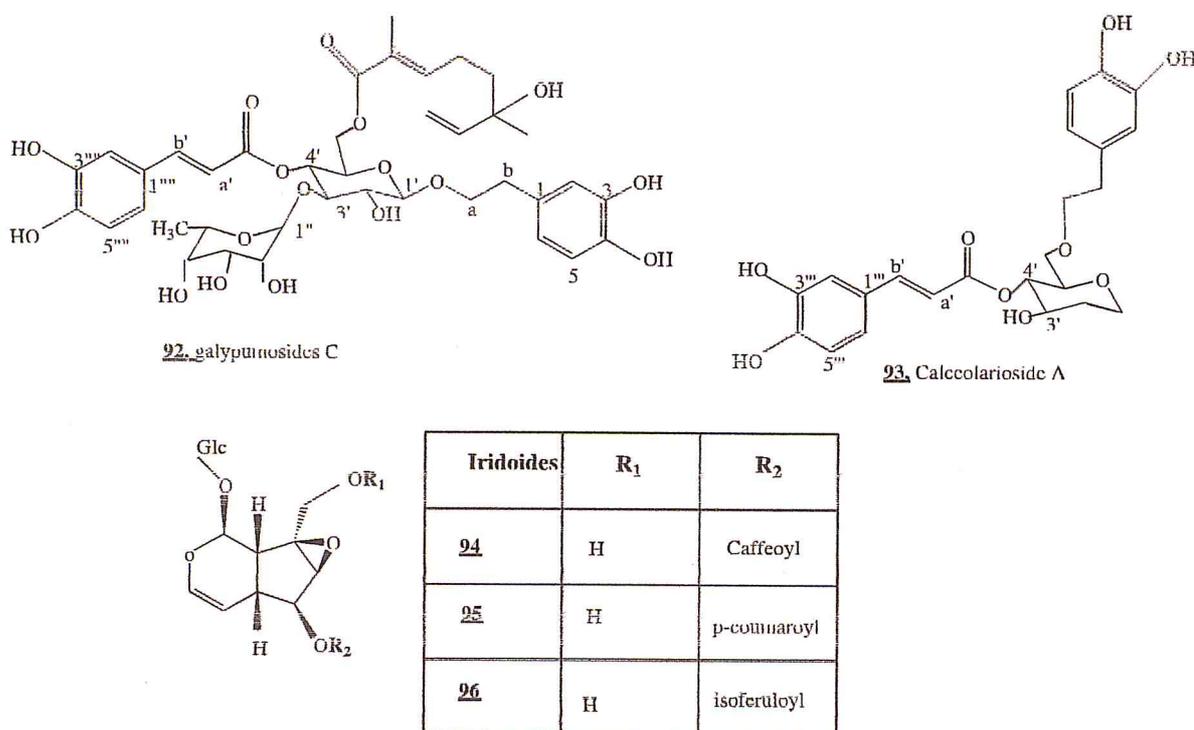


Figure 13 : Les principaux métabolites secondaires isolés de l'espèce *Globularia alypum*.

7.5. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles de l'espèce *Globularia alypum*

Dans la bibliographie, peu de recherches ont été munis sur la composition de l'huile essentielle de l'espèce *Globularia alypum*. Cela peut être dû aux faibles rendements obtenus, comme par exemple : 0,08% pour l'espèce récoltée à Sétif et 0,06% et celle récoltée à Khenchela.

Les seules recherches effectuées sur la composition de l'huile essentielle de l'espèce *Globularia alypum* récoltée en Algérie [95], montrent la présence de 39 composés identifiés, dont le pourcentage le plus élevé est enregistré pour l'acide palmatique (14.64% pour l'espèce de Sétif et 29.52% pour l'espèce de Khenchela). D'autres composés importants sont également présents tels que : l'isomère de phytol (9.9-5.43%), le (Z,Z)-6,9-cis-3,4-époxy-nonadécadi (8.27-5.45%), l'acide-bis 1,2-Benzénedicarboxylique (4.68-6.09%), le L-linalool (3.49-3.83%) et le heptadécane (2.29-3.28%).

Le tableau 8, présente la composition d'huile essentielle de deux populations de l'espèce *Globularia alypum*.

Tableau N° 8 : Représentation de la composition d'huile essentielle de *Globularia alypum* en provenance de Sétif et de Khenchela [95].

| N° | Composés | Composition | |
|----|---------------------------------------|-------------|-----------|
| | | Sétif | Khenchela |
| 01 | Camphène | 0.36 | 0.27 |
| 02 | 1-octen-3-ol | 10.32 | 0.82 |
| 03 | L-linalool | 3.49 | 3.83 |
| 04 | L-camphore | 2.27 | 0.30 |
| 05 | α -terpinéol | 4.53 | 0.18 |
| 06 | Cis-3-hexenyl α -méthylbutyrat | 1.28 | 1.07 |
| 07 | Géraniol | 0.61 | 0.23 |
| 08 | 4-vinyl-2-méthoxy-phénol | 0.36 | 0.77 |
| 09 | Cis-3-hexenyl tiglate | 2.12 | 0.20 |
| 10 | Eugénol | 3.06 | 0.22 |
| 11 | β -damascénone | 0.63 | 0.20 |
| 12 | β -caryophyllène | 0.58 | 2.57 |
| 13 | Géranylacétone | 0.47 | 0.24 |
| 14 | Trans- β -farnésène | 1.34 | 0.26 |
| 15 | β -ionone | 0.55 | 1.25 |
| 16 | Nérolidol « E- » | 2.64 | 0.24 |
| 17 | Cis-3-hexenyl benzoate | 4.19 | 0.32 |
| 18 | Acide benzoïque | 0.46 | 0.24 |
| 19 | 5-méthylène-6-hepten-3-ol | 0.42 | 0.32 |
| 20 | Epizonarène | 0.65 | 0.43 |
| 21 | α -bisabolol | 4.51 | 1.75 |
| 22 | Zérumbone | 0.75 | 0.45 |
| 23 | Acide myristique | 0.16 | 0.22 |
| 24 | 2-pentadécaneone 6,10, 14-triméthyl | 1.30 | 5.41 |
| 25 | Acide bis-1,2-Benzénedicarboxylique | 4.68 | 6.09 |
| 26 | Acide hexadécanoïque | 0.76 | 0.33 |
| 27 | Acide dibu-1,2-Benzénedicarboxylique | 1.47 | 0.38 |
| 28 | Acide hexadécanoïque | 14.64 | 29.52 |
| 29 | Gérmacrène-B | 1.84 | 3.87 |
| 30 | Acide 8-Octadécenoïque | 0.74 | 6.01 |
| 31 | Phytol isomer | 9.90 | 5.43 |
| 32 | (Z,Z)-6,9-cis-3,4-époxy-nonadécadi | 8.27 | 5.45 |
| 33 | Nonadécane | 0.89 | 3.21 |
| 34 | Tétracosane | 0.51 | 0.27 |
| 35 | Heptadécane | 2.29 | 3.28 |
| 36 | Hexacosane | 0.60 | 0.21 |
| 37 | Docosane | 3.81 | 1.61 |
| 38 | Eicosane | 0.85 | 1.67 |
| 39 | Nonacosane | 0.63 | 0.60 |

En conclusion, la recherche bibliographique effectuée sur le genre *Globularia* nous a permis de référencier 96 composés qui se répartissent en trois groupes, celui des composés phénoliques qui regroupe la majorité des composés, dont la plupart sont des flavonoïdes (29 composés) suivi des phénylétanoïdes (18 composées), puis des acides phénols (8 composés). Par ailleurs, les iridoïdes de types glycosides sont majoritairement présents dans ce genre dont 41 composés ont été recensés.

Chapitre 2

Étude de la composition chimique de l'espèce *Globularia alypum*

I. Extraction de métabolites secondaires de l'espèce *Globularia alypum*

I.1. Matériel végétal

La plante a été récoltée au mois d'avril de l'année 2017 dans la région de Blida (Oued-djer). Après séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux, et broyées grossièrement dans un moulin électrique, puis pesées.

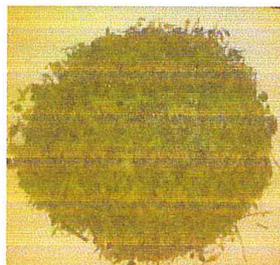


Figure 14 : *Globularia alypum* sèche.

I.2. Mode d'extraction

Dans cette partie nous avons procédé à l'extraction des métabolites secondaires de la plante *Globularia alypum* en utilisant deux protocoles différents :

a. Protocole d'extraction 1

Le matériel végétal broyé (60 g) est soumis à une extraction par macération dans 550 ml de méthanol pendant 72 heures. Cette opération est répétée 3 fois. Après filtration, le filtrat est évaporé à sec dans un évaporateur rotatif à 40°C, ce dernier est repris par 20 ml de l'eau distillée bouillante puis conservé dans le réfrigérateur pendant une nuit.

L'extraction liquide-liquide est réalisée selon la méthode de Markham [96], en utilisant une série de solvants à polarité croissante. Le mélange est ainsi épuisé par l'hexane, le chloroforme puis l'acétate éthylique. Chaque fraction a été évaporée à une température de 40°C à sec et à pression réduite pour donner l'extrait hexanique (EHx), l'extrait chloroformique (EC) et l'extrait acétate éthylique (EAc).

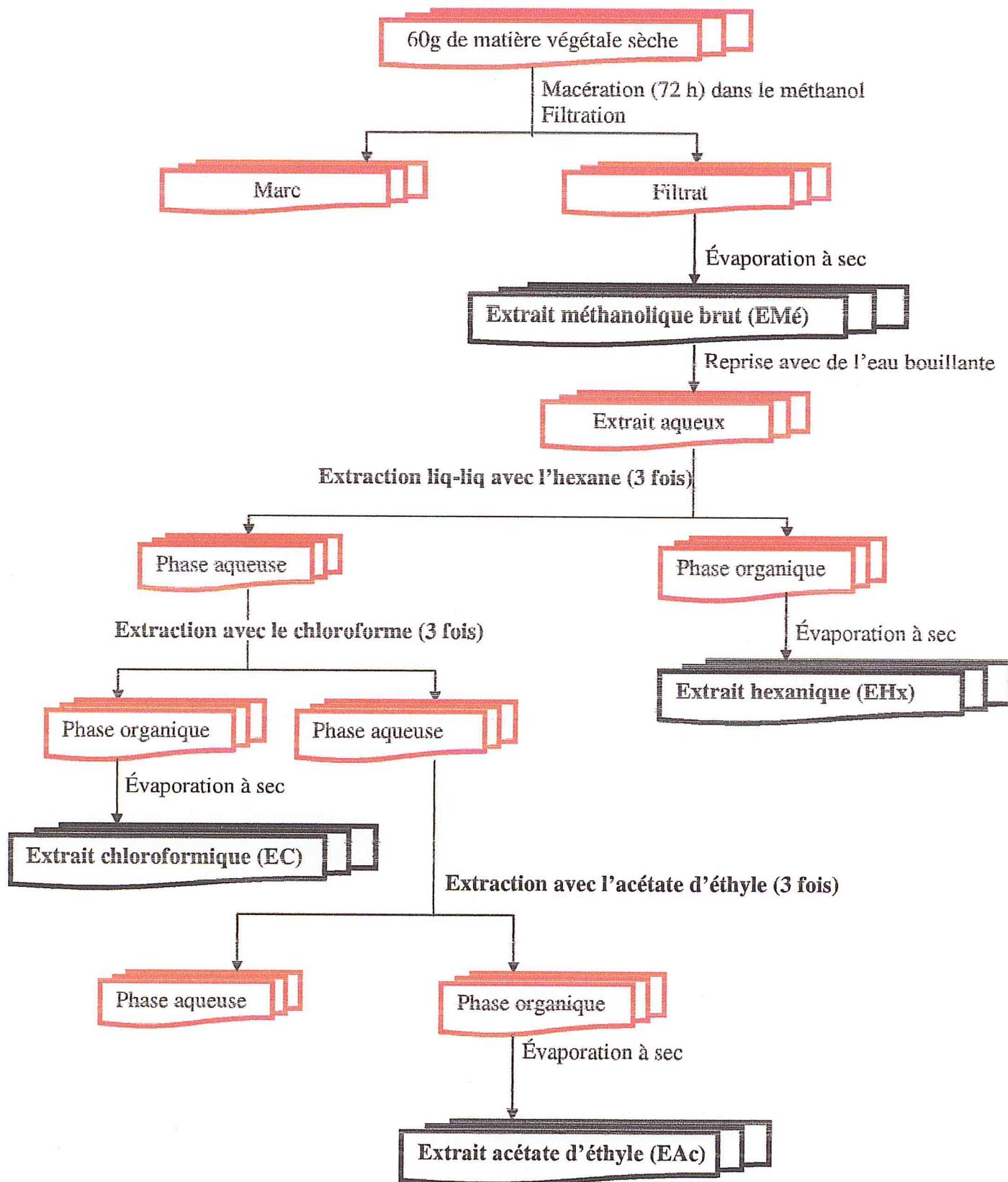


Figure 15 : Protocole d'extraction 1.

b. Protocole d'extraction 2 :

D'autre part, 60 g de la plante ont été macérés dans l'hexane pendant 72 heures. Après filtration et évaporation à sec du filtrat, on a obtenu l'extrait hexanique (EHxb) qui a pesé 1.02 g. Le résidu (marc) a subi une extraction à chaud à l'aide d'un soxhlet pendant 3 heures, avec l'acétone comme solvant. Ainsi, la plante a été placée dans une cartouche qui sera ensuite insérée au centre du soxhlet. Lorsque le solvant atteint le degré d'ébullition, la vapeur monte à travers un circuit d'évaporation, se condense au niveau du condensateur et après son contact direct avec le réfrigérant, il retombe sur l'extracteur faisant macérer la plante dans le solvant. Ce dernier s'enrichit progressivement de composés solubles. Enfin, l'évaporation à sec du mélange obtenu à l'aide d'un évaporateur rotatif, nous a permis d'obtenir 0.89 g de l'extrait acétonique.

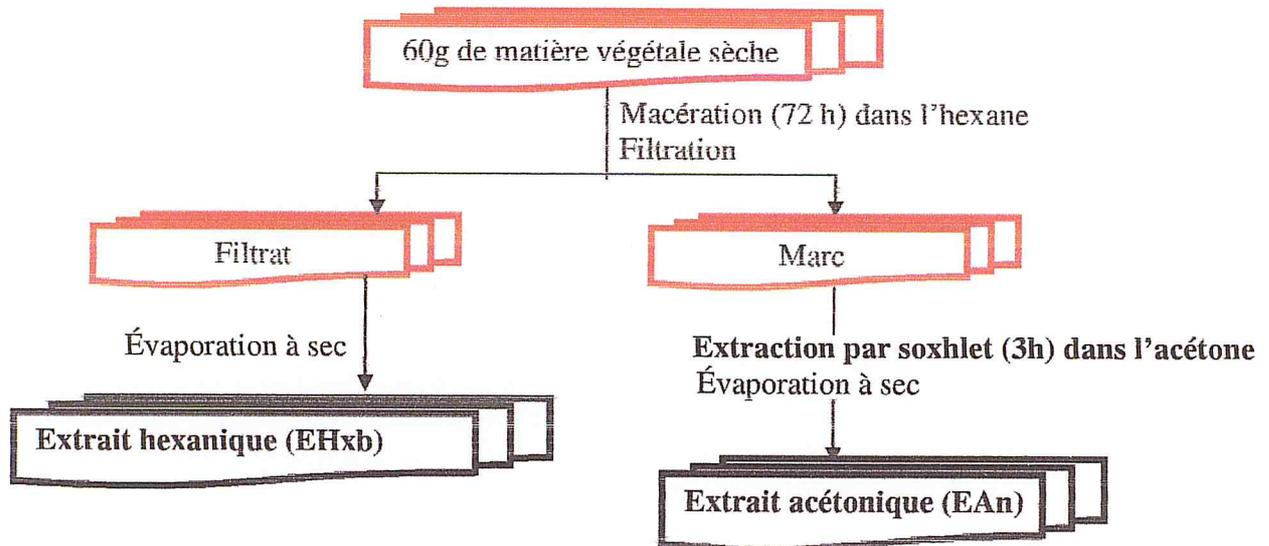


Figure 16 : Protocole d'extraction 2.

I.3. Détermination du rendement :

Les extraits récupérés après évaporations à sec ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant. Le rendement a été déterminé par rapport à 60 g de matériel sec par la formule suivante :

$$R\% = \frac{\text{Masse de résidu d'extrait}}{\text{Masse de la poudre végétale}} \times 100$$

La couleur, l'aspect, la masse et le rendement de chaque extrait sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau N° 9 : Couleur, aspect, masse et rendement des différents extraits de la plante *Globularia alypum*.

| Extrait | Couleur | Aspect | Masse (g) | Rendement (%) |
|------------------------|-----------------|--------------|-----------|---------------|
| Méthanolique (EMé) | Vert foncée | Pâteux | 14.44 | 24.07 |
| Hexanique (EHx) | Marron foncée | Visqueux | 1.22 | 2.03 |
| Chloroformique (EC) | Marron jaunâtre | Visqueux | 0.13 | 0.22 |
| Acétate d'éthyle (EAc) | Jaune miel | Solide jaune | 2.14 | 3.57 |
| Hexanique (EHxb) | Jaune | Visqueux | 1.02 | 1.7 |
| Acétonique (EAn) | Vert clair | Visqueux | 0.89 | 1.48 |

I.4. Criblage phytochimique

Nous avons effectué un criblage phytochimique. Afin de déterminer les différentes catégories de molécules secondaires présentes dans la plante. Deux extraits (méthanolique et acétonique) ont été soumis aux différents tests.

I.4.a. Les composés phénoliques (Test de chlorure ferrique)

Une petite quantité de chaque extrait a été dissous dans 5 ml d'eau distillée et quelques gouttes de chlorure ferrique de 1% (poids/volume) ont été ajoutées [97]. L'apparition d'une couleur verte-foncée indique la présence des composés phénoliques.

I.4.b. Les flavonoïdes (Test de réactif alcalin) [97]

Quelques gouttes d'hydroxyde de sodium (NaOH) ont été ajoutées aux extraits dissous dans de l'eau distillée, l'apparition d'une couleur jaune intense indique la présence des flavonoïdes. La disparition de la couleur après l'addition de l'acide chlorhydrique dilué confirme la présence des flavonoïdes.

I.4.c. Les tanins

A 1 mL de chaque extrait aqueux ou alcoolique a été additionné de quelques gouttes de chlorure ferrique (1%) (poids/volume), le développement de coloration bleu, bleu noir ou vert indique la présence des tanins [98].

I.4.d. Les terpénoïdes

5 ml d'un extrait aqueux ont été délicatement mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré. Le développement d'une coloration marron à l'interface indique la présence des terpénoïdes [99].

I.4.e. Les coumarines

3 ml d'une solution de NaOH à 10% (poids/volume) ont été ajoutés à une solution aqueuse, préparée à partir de la dissolution d'une quantité de chaque extrait dans de l'eau distillée. L'apparition de la couleur jaune indique la présence des coumarines [100].

I.4.f. Les saponines

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse. Leur détection a été réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, après agitation, le mélange a été laissé reposer pendant 20 minutes puis la teneur en saponosides est évaluée [98].

*** Résultats et discussion**

L'évaluation préliminaire de la composition chimique de la partie aérienne de l'espèce *Globularia alypum*, a permis de mettre en évidence la présence de quelques constituants chimiques. Les résultats du screening phytochimique des deux extraits (méthanolique et acétonique) de la plante sont récapitulés dans le tableau 10.

Tableau N° 10 : Résultats des tests phytochimiques des extraits (EMé et EAn) de *Globularia alypum*.

| Composés | Extrait méthanolique (EMé) | Extrait acétonique (EAn) |
|----------------------|----------------------------|--------------------------|
| composés phénoliques | +++ | ++ |
| Flavonoïdes | +++ | +++ |
| Tanins | ++ | + |
| Terpénoïdes | +++ | ++ |
| Coumarines | + | + |
| Saponines | ++ | + |

+++ : Fortement présent ; ++ : Moyennement présent ; + : Faiblement présent ;

Les résultats obtenus montrent que les deux extraits (EMé et EAn) étudiés sont riches en composés phénolique, en flavonoïdes, en tanins, en terpénoïdes, en coumarines et en saponines.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature par les travaux de Taghzouti et collaborateurs en 2016 [101], qui montrent une forte présence des composés phénoliques, des flavonoïdes, des tannins, des terpénoïdes, des coumarines et des glycosides cardiaques au niveau des feuilles, des tiges et des racines de l'espèce *Globularia alypum*. Tandis que les saponines sont détectées seulement dans l'extrait méthanolique.

Par ailleurs, Une autre étude phytochimique réalisée par Harzallah et collaborateurs en 2010, [102] montre que les extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle obtenus à partir des feuilles de *Globularia alypum* ne contiennent pas des coumarines et des tanins.

I.5. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu [103].

I.5.1. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 765 nm [104].

I.5.2. Protocole expérimentale

I.5.a. Courbe d'étalonnage

Un standard de calibration a été préparé, en utilisant l'acide gallique de différentes concentration allant de 0,0156 jusqu'à 0,125 mg/ml.

On prend 1 ml de la solution diluée, on lui ajoute 5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. On laisse le mélange 5 minutes puis on le neutralise avec 4 ml de carbonate de sodium. Après agitation, la solution est maintenue dans l'obscurité et à la température ambiante pendant 1 heure. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765 nm. La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure 17 [103].

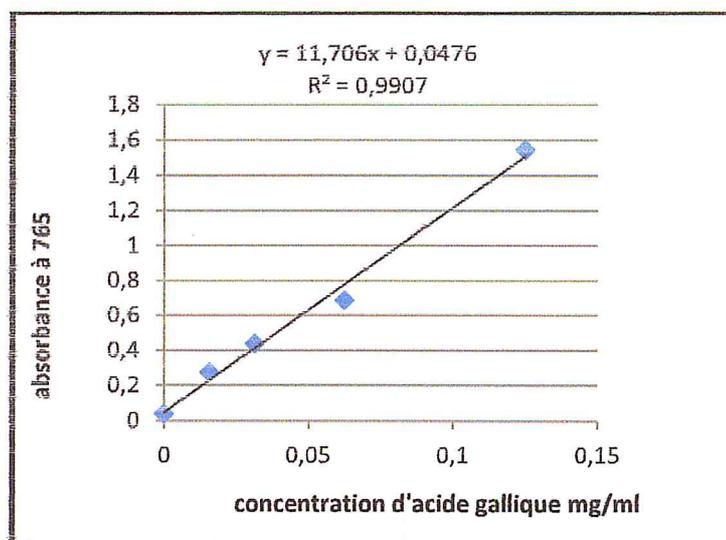


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

I.5.b. Dosage des polyphénols totaux

Afin de déterminer la quantité de polyphénols totaux présents dans trois extraits : acétate d'éthyle (EAc), méthanolique (EMé) et acétonique (EAn) de l'espèce *Globularia alypum*, nous avons utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu.

Nous avons préparé, dans un premier temps, une solution mère d'extrait de plante, 2 mg de chaque extrait (EAc, EMé et EAn) ont été mélangés avec 1ml de méthanol et 6,5 ml d'eau distillée.

1 ml de la solution mère a été prélevé et introduit dans un tube sec. On a ajouté à cette solution 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu et 5 ml d'eau distillée. Pour finir, on ajoute au mélange 4 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 7,5 g/ml. Après incubation pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante, on a lu l'absorbance à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Le total des composés phénoliques a été déterminé selon l'équation suivante [103]:

$$T = C \cdot V / M$$

T : Le total des composés phénoliques (mg EAG/g d'extrait sec de la plante).

C : Concentration d'extrait équivalent à l'acide gallique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

V : Volume d'extrait (ml).

M : Poids sec d'extrait de la plante (g).

*** Résultats et discussion**

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique, et exprimée en milligrammes par gramme de la matière sèche équivalent en acide gallique. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 11.

Tableau N° 11 : Taux des polyphénols existant dans les extraits EAc, EMé et EAn de *Globularia alypum*.

| Échantillon dosé | Taux de polyphénols totaux (mg/g) |
|------------------|-----------------------------------|
| EMé | 42 |
| EAc | 50 |
| EAn | 14 |

Ces résultats sont représentés sous forme d'histogramme (Figure 18).

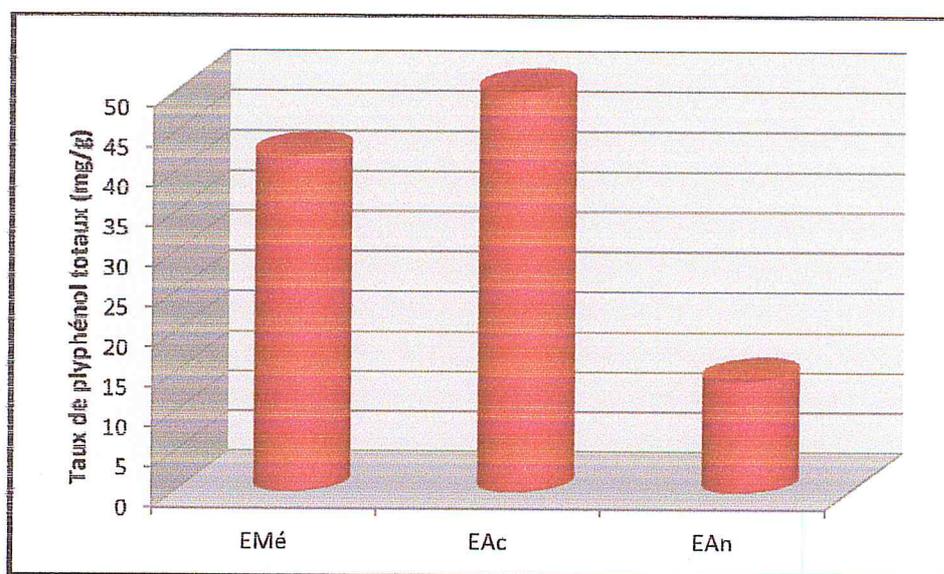


Figure 18 : Histogramme représente le taux des phénols totaux des extraits méthanolique (EMé), acétate d'éthyle (EAc) et acétonique (EAn).

D'après les résultats représentés dans le tableau et la figure ci-dessus, on remarque que la quantité des composés phénoliques varie entre 14 et 50 mg/g de la matière sèche. Le taux des composés phénoliques le plus élevé a été détecté dans l'extrait de l'acétate d'éthyle (50 mg/g), suivi par l'extrait méthanolique avec une teneur de 42 mg/g, tandis que, l'extrait acétonique est le plus pauvre avec une teneur de 14 mg/g.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Boussoualim (2016) [105], qui a montré que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus riche en polyphénols avec une teneur de 157 mg/g, suivi de

extrait méthanolique et l'extrait aqueux avec une valeur de 140 et 100 mg/g respectivement, tandis que, l'extrait chloroformique est le plus pauvre avec une valeur de 80 mg/g.

I.6. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM).

I.6.a. Définition et principe de la CCM

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants ; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La chromatographie sur couche mince, est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants.

On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange à analyser. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (Rf) [106]:

$$R = \frac{\text{hauteur de la tâche}}{\text{hauteur du front du solvant}}$$

I.6.b. Chromatographie sur couche mince des composés phénolique de nos extraits de plante

Pour avoir une idée sur la nature des constituants que l'on peut rencontrer, nous avons procédé à une analyse préliminaire des extraits acétate d'éthyle (EAc), méthanolique (EMé) et acétonique (EAn) par CCM.

Pour cela, une partie de chaque extrait a été solubilisée dans le méthanol et déposée sur plaques CCM et éluee dans un système de solvant Hexane/Acétate d'éthyle (60/40). Ensuite, les chromatogrammes sont révélés avec les vapeurs de l'ammoniaque. Cette étape nous a permis de mettre en évidence la présence de flavonoïdes détectés grâce à la couleur de spots sous lumière UV à 365 nm et après révélation. Les résultats de la chromatographie sur couche mince des différents extraits sont représentés dans le tableau 12.

Tableau N° 12 : Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits de l'espèce *Globularia alypum*.

| Extraits étudiées | R _f | Couleur de spots | |
|-------------------|----------------|------------------|------------------|
| | | Sous UV | Après révélation |
| EMé | 0.17 | Rose bleu | Jaune |
| | 0.28 | Rose | Jaune |
| | 0.42 | Rose | Jaune |
| | 0.45 | Rose bleu | Jaune |
| | 0.48 | Rose | Jaune |
| | 0.57 | Rose | Vert |
| | 0.60 | Rose | Vert |
| | 0.63 | Orange | Bleu |
| | 0.78 | Rose violet | Jaune |
| EAc | 0.1 | Bleu | Jaune |
| | 0.22 | Violet | Marron |
| | 0.48 | Rose | Jaune |
| | 0.72 | Bleu | Jaune |
| | 0.80 | Violet | Jaune |
| | 0.94 | Violet | Vert |
| EAn | 0.03 | Violet | Vert |
| | 0.09 | Rose | Jaune |
| | 0.21 | Rose | Jaune |
| | 0.35 | Rose | Jaune |
| | 0.41 | Violet | Jaune |
| | 0.48 | Violet | Jaune |
| | 0.64 | Bleu | Vert |
| | 0.74 | Bleu | Vert |
| | 0.91 | Bleu | Jaune |
| | 0.97 | Violet | Bleu |

Les résultats obtenus de la chromatographie sur couche mince CCM des extraits (EMé, EAc, EAn) montrent que ces derniers sont très riches en métabolites secondaires, en particulier en flavonoïdes cela confirme les résultats obtenus par le criblage phytochimique.

Par comparaison avec la littérature [107], la présence des spots de coloration jaune et violet dans les chromatogrammes de nos extraits, indique la présence dans l'espèce étudiée, des flavonols, des flavonones, des isoflavonones et des flavones.

II. Extraction et analyse de l'huile essentielle

II.1. Extraction de l'huile essentielle

Le matériel végétal sèche est soumis à une hydrodistillation au moyen d'un dispositif d'extraction type Clevenger pendant trois heures. Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. L'opération consiste à introduire 150 g de masse végétale sèche dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile et enfin conservée dans un flacon opaque bien scellé à température basse (4-5°C) jusqu'à son analyse GC/MS.

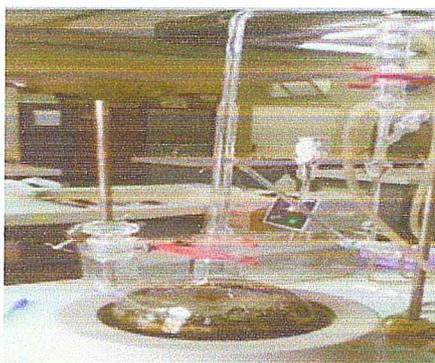


Figure 19 : Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation.

La couleur, l'aspect, la masse et le rendement de l'huile essentielle sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau N° 13 : Couleur, aspect, masse et rendement de l'huile essentielle de *Globularia alypum*.

| Matière végétale | Couleur | Aspect | Masse (g) | Rendement (%) |
|------------------|---------|--------|-----------|---------------|
| Sèche | Jaune | Pâteux | 0.1 | 0.07 |

Nous avons réalisé l'extraction de l'huile essentielle de *Globularia alypum* par hydrodistillation, le rendement en huile essentielle obtenus à partir de la partie aérienne de la plante sèche est de l'ordre de 0.07%.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature par Ramdani et Lograda [96], qui montrent des rendements de 0.08% et 0,06% respectivement aux populations de Sétif et de Khenchela.

II.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

L'analyse GC/MS a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse HEWLETT-PACKARD-HP-6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5972, dans les conditions suivantes :

- Une colonne capillaire de type HP-5MS (polydiméthylsiloxane 100%), de longueur 30 m d'un diamètre interne de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0.25 µm.
- un gaz vecteur (hélium) d'un débit de 0.8 ml/min
- Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale a 70 eV.
- Injection d'une quantité de 0.20 µl en mode Split : 50:1.
- Température de l'injecteur : 250°C.
- Programmation de température : 50°C pendant 5 min ; 5°C/ min jusqu'à 280°C pendant 20 min.

* Résultats et discussion

L'analyse par GC/MS de l'huile essentielle de *Globularia alypum* dans les conditions citées auparavant (II.2) montre la présence de 35 composés dont nous avons pu identifier 20 composés.

Les composés obtenus, listés selon leur ordre d'élutions dans la colonne, sont résumés dans le tableau 14.

Tableau N° 14 : Composition de l'huile essentielle de *Globularia alypum*.

| Ordre d'élution | Nom du composé | Formule moléculaire | Tr (min) | Air (%) |
|-----------------|------------------------------|--|---------------|---------------|
| 1 | α -Terpinolène | C ₁₀ H ₁₆ | 10.728 | 0.444 |
| 2 | Linalyl propionate | C ₁₃ H ₂₂ O ₂ | 14.756 | 1.678 |
| 3 | 2-tétradécanol | C ₁₄ H ₃₀ O | 19.530 | 1.808 |
| 4 | Cis-3-hexanyl tiglate | C ₁₁ H ₁₈ O ₂ | 20.353 | 1.020 |
| 5 | Eugénol | C ₁₀ H ₁₂ O ₂ | 22.065 | 1.132 |
| 6 | β -Damascénone | C ₁₃ H ₁₈ O | 22.949 | 0.831 |
| 7 | Decyl méthyl cétone | C ₁₂ H ₂₄ O | 23.387 | 1.221 |
| 8 | β -Damascone | C ₁₃ H ₂₀ O | 24.186 | 0.593 |
| 9 | Géranyl acétone | C ₁₃ H ₂₂ O | 25.798 | 1.006 |
| 10 | NI | - | 26.197 | 0.934 |
| 11 | α -Curcumène | C ₁₅ H ₂₂ | 27.110 | 1.266 |
| 12 | β -Ionone | C ₁₃ H ₂₀ O | 27.187 | 1.163 |
| 13 | NI | - | 27.586 | 1.317 |
| 14 | NI | - | 28.860 | 0.629 |
| 15 | NI | - | 29.174 | 1.539 |
| 16 | NI | - | 29.683 | 1.230 |
| 17 | Dectylol | C ₁₅ H ₂₆ O | 30.240 | 0.864 |
| 18 | Cis-nerolidol | C ₁₅ H ₂₆ O | 30.411 | 1.117 |
| 19 | Cis-3-hexanyl benzoate | C ₁₃ H ₁₆ O ₂ | 30.668 | 1.972 |
| 20 | NI | - | 30.839 | 0.563 |
| 21 | (+) Spathuléol | C ₁₅ H ₂₄ O | 31.096 | 7.031 |
| 22 | NI | - | 32.303 | 1.268 |
| 23 | Acide tétradécanoïque | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | 38.272 | 0.293 |
| 24 | NI | - | 40.516 | 0.843 |
| 25 | NI | - | 42.941 | 0.682 |
| 26 | Acide hexadécanoïque | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 45.001 | 1.450 |
| 27 | NI | - | 47.064 | 2.518 |
| 28 | NI | - | 48.648 | 1.052 |
| 29 | Phytol | C ₂₀ H ₄₀ O | 49.266 | 11.104 |
| 30 | NI | - | 50.032 | 0.525 |
| 31 | Acide 9,12-octadécadiénoïque | C ₁₈ H ₃₂ O ₂ | 50.422 | 3.792 |
| 31 | Tricosane | C ₂₃ H ₄₈ | 54.911 | 1.685 |
| 33 | NI | - | 56.846 | 2.243 |
| 34 | NI | - | 56.994 | 4.227 |
| 35 | NI | - | 59.153 | 1.320 |

Ces résultats montrent que cette huile est majoritairement composée de (+) spathulénol (7.031%) et de phytol (11.104%).

Par comparaison avec la composition de l'huile essentielle décrite dans la littérature [96], pour l'espèce récoltée en Algérie, nous avons constatés que notre huile renferme globalement, la même composition, mais avec des pourcentages différents. Ainsi, les produits majoritaires d'huile essentielle de l'espèce *Globularia alypum* récolté à Blida sont : l'acide hexadécanoïque, le (Z,Z)-6,9-cis-3,4-époxy-nonadécadi (8.27-5.45%), l'acide bis 1,2-Benzénedicarboxylique (4.68-6.09%), le linalool (3.49-3.83%) et le heptadécane (2.29-3.28%), le (+) spathulénol (7.031%) et le phytol (11.104%).

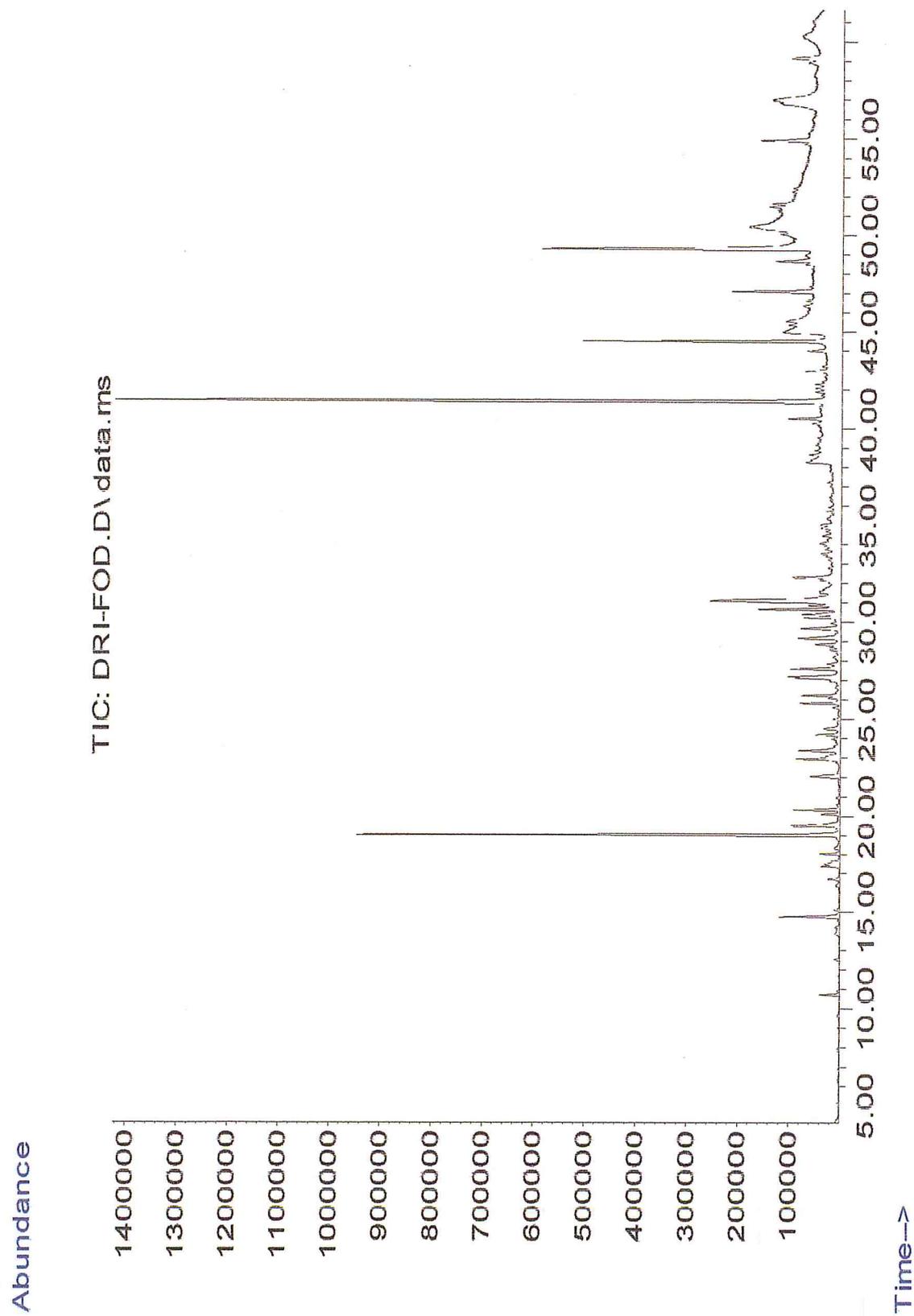
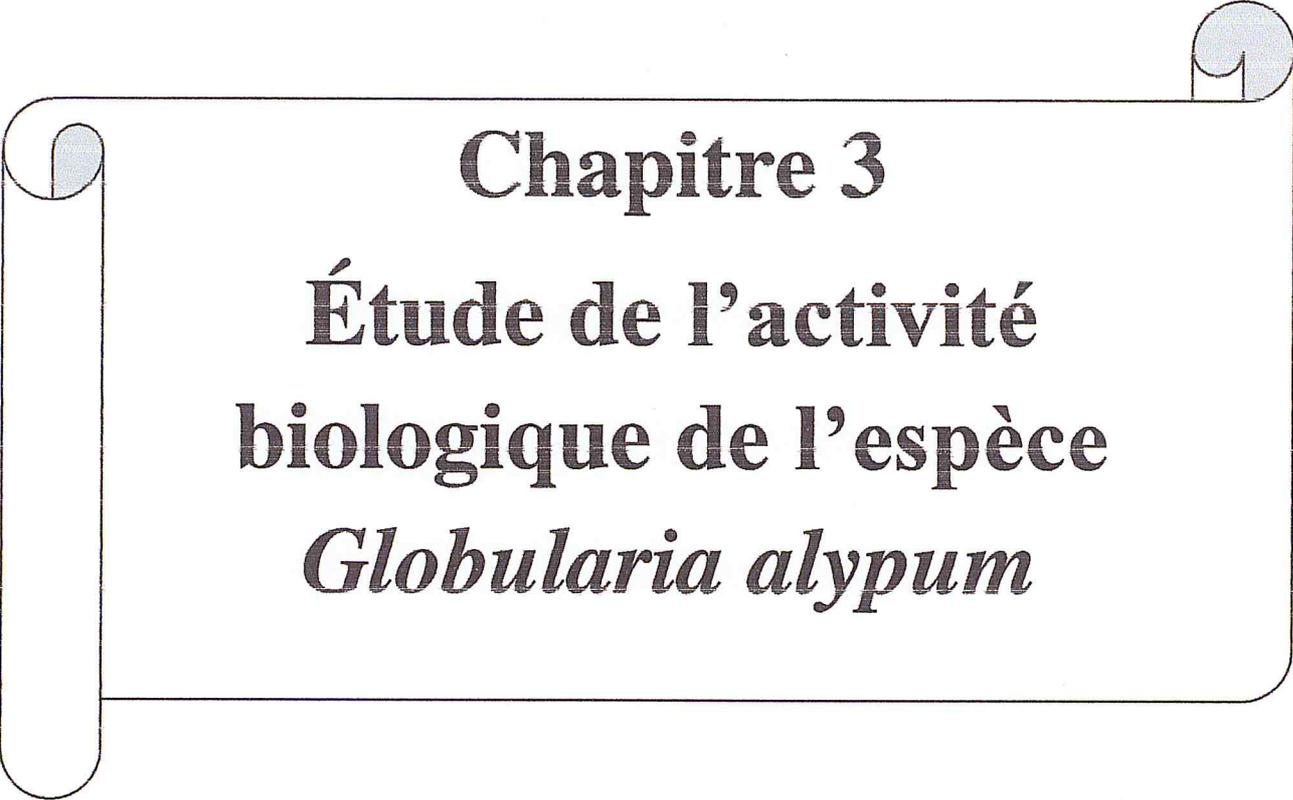


Figure 20 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Globularia alypum*.



Chapitre 3
Étude de l'activité
biologique de l'espèce
Globularia alypum

I. Étude de l'activité antioxydante de l'espèce *Globularia alypum*

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physique (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène [108].

I.1. Définition

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faible concentration par rapport au substrat oxydable, retardent ou stoppent le processus d'oxydation, et ainsi régulent l'équilibre redox cellulaire. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O^\bullet) [109].

I.2. Principe du test de DPPH

Le DPPH (2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl) est un radical libre stable de coloration violette foncée et absorbe à 517 nm, lorsqu'il est réduit, en présence des composés antiradicalaires, il change de couleur en virant au jaune selon la réaction suivant :

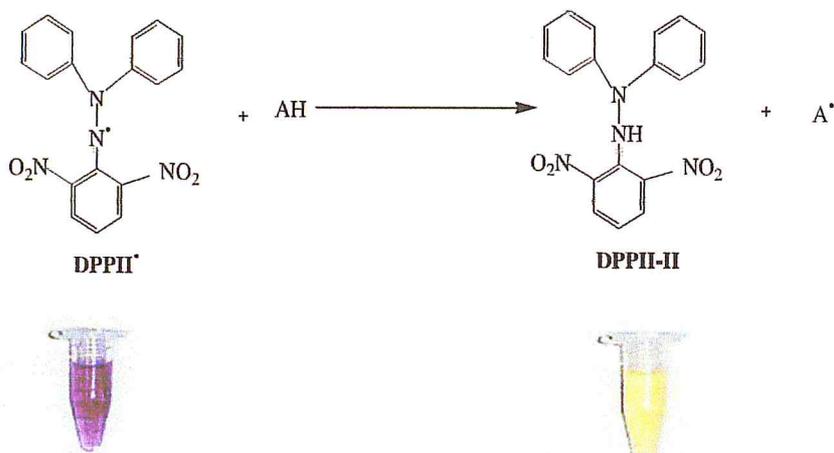


Figure 21 : Réaction de test de DPPH (2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl).

Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antioxydant de l'échantillon. L'activité antiradicalaire des extraits a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH^{*} suivant l'équation [110] :

$$\%DPPH = [(Abs\ b - Abs\ e)/Abs\ b] \times 100$$

%DPPH : Taux de DPPH piégé ou taux d'inhibitions.

Abs b : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol).

Abs e : Absorbance du composé d'essai.

I.3. Protocole expérimental [111].

- La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 4mg de DPPH dans 100 ml de méthanol, cette solution ne se conserve pas plus de 4-5 jours à -5 C° et à l'obscurité.
- Les extraits (EAc, EMé, EAn) ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu. Pour chaque extrait, on prépare une solution à raison de 5 mg/ml, à partir de laquelle on fait ensuite des dilutions pour en avoir une gamme de concentration allant de 1 à 4 mg/ml.
- Le test s'effectue en mélangeant 3ml de la solution précédente de DPPH avec 30 µl de l'extrait à tester à différentes concentrations. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.
- L'antioxydant de référence ou le contrôle positive (l'acide ascorbique) et le contrôle négative (le blanc) ont été également préparés selon la même méthode décrite précédemment.
- Après une période d'incubation de 30 min à la température ambiante, l'absorbance est lue à 517nm. L'inhibition du radical libre DPPH par la vitamine C a été également mesurée avec les mêmes concentrations (de 1 à 4 mg/ml).

*** Résultats et discussion**

L'activité antiradicalaire de trois extraits (EMé, EAc et EAn) de l'espèce *Globularia alypum* a été évaluée par la méthode de DPPH. L'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un UV-Visible. L'évaluation du pouvoir antiradicalaire de nos extraits (EAc, EMé et EAn) a été réalisée par comparaison avec celle de l'antioxydant (la vitamine C), en faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant.

Les tableaux 15 et 16 ainsi que, les figures 22 et 23 illustrent l'efficacité de nos extraits à piéger le radical libre DPPH, traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations.

Tableau N° 15 : Absorbance et pourcentage de l'activité antiradicalaire des différentes concentrations des extraits (EAc, EMé et EAn) et du standard vis-à-vis du radical libre DPPH.

| | C (mg/ml) | 0.1 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 5 |
|--------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| EMé | Absorbance | 0.691 | 0.670 | 0.585 | 0.441 | 0.183 | 0.050 | 0.043 | 0.039 |
| | % d'inhibition | 18.42 | 20.90 | 30.93 | 47.93 | 78.39 | 94.10 | 94.92 | 95.40 |
| EAc | Absorbance | 0.800 | 0.781 | 0.741 | 0.493 | 0.361 | 0.086 | 0.052 | 0.049 |
| | % d'inhibition | 5.55 | 7.79 | 12.51 | 41.79 | 62.69 | 89.85 | 93.86 | 94.21 |
| EAn | Absorbance | 0.627 | 0.622 | 0.543 | 0.417 | 0.363 | 0.265 | 0.165 | 0.108 |
| | % d'inhibition | 25.97 | 26.56 | 35.89 | 50.77 | 57.14 | 68.71 | 80.52 | 87.25 |
| Vit. C | Absorbance | 0.692 | 0.669 | 0.584 | 0.113 | 0.052 | 0.051 | 0.043 | 0.027 |
| | % d'inhibition | 38.92 | 40.95 | 48.45 | 90.02 | 95.41 | 95.49 | 96.20 | 97.61 |

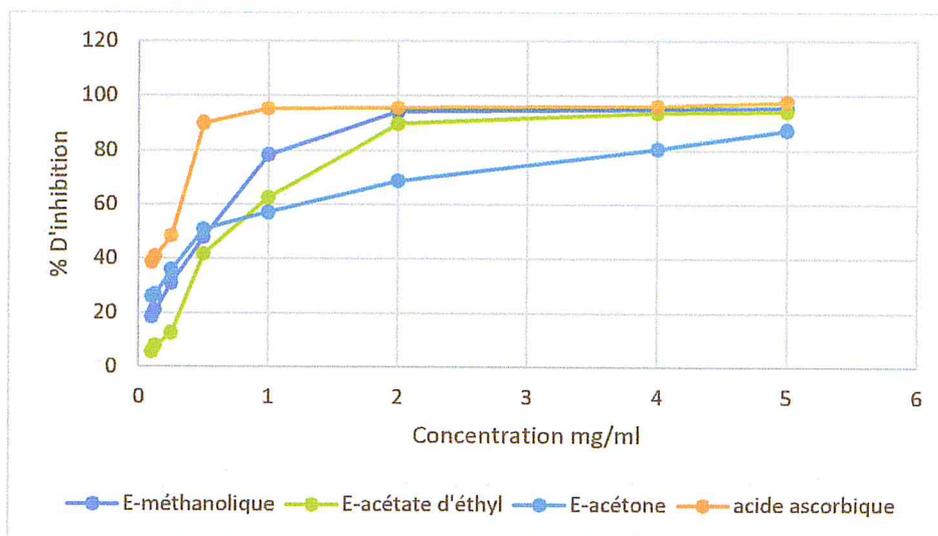


Figure 22 : Le pourcentage d'inhibition des extraits testés et de la vitamine C.

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en CI_{50} , ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH[•] [112]. Ces CI_{50} sont déterminées à partir de la figure 22, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage.

A partir des courbes des taux d'inhibition, nous avons pu déduire graphiquement les valeurs de CI_{50} de nos extraits, ils sont représentés dans le tableau 16. La valeur de l' CI_{50} est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (taux d'inhibition I%) d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Plus la valeur d' CI_{50} est faible, plus l'activité antiradicalaire d'un composé est appréciable.

Tableau N° 16 : Valeurs de CI_{50} des extraits EMé, EAc et EAn de *Globularia alypum* et de la Vit. C.

| Composés | CI_{50} (mg/ml) |
|----------|-------------------|
| EMé | 0.52 |
| EAc | 0.60 |
| EAn | 0.49 |
| Vit. C | 0.28 |

Ces résultats sont représentés aussi sous forme d'histogramme (Figure 23).

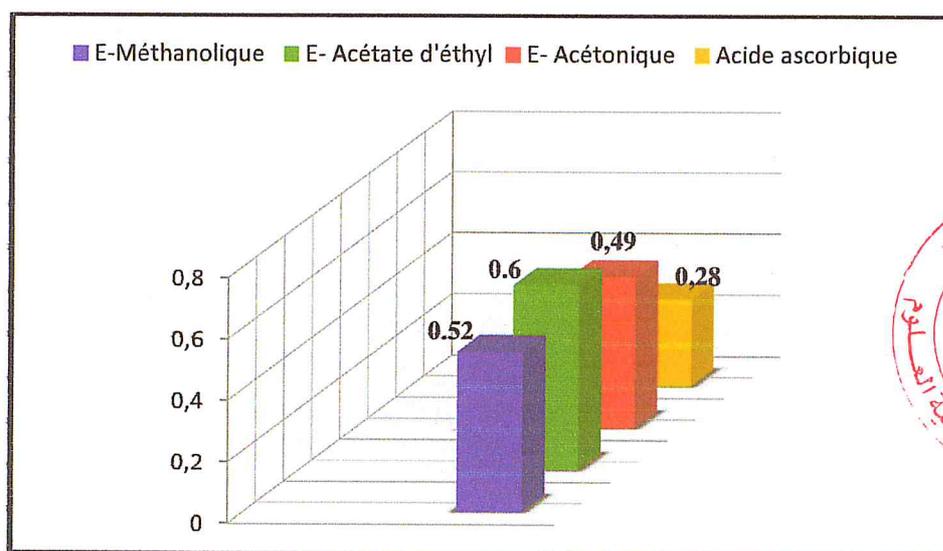


Figure 23 : Histogramme de CI_{50} des différents extraits de *Globularia alypum* et de la vitamine C en mg/ml.

D'après l'histogramme illustré dans la figure 23, nous remarquons que les valeurs des CI_{50} des extraits s'échelonnent entre 0,6 mg/ml pour l'extrait acétate d'éthyle, 0,52 mg/ml obtenus avec l'extrait méthanolique et 0,49 mg/ml pour l'extrait acétonique. Un fort pouvoir antiradicalaire est noté pour l'extrait acétonique, se traduisant par un CI_{50} assez bas, comparable à celui du composé standard, l'acide ascorbique (0,28 mg/ml).

Les extraits de l'espèce végétale *Globularia alypum* peuvent être classés par ordre décroissant du pouvoir antiradicalaire, comme suit :

Extrait acétonique > extrait méthanolique > extrait d'acétate d'éthyle.

Par comparaison avec la littérature [113], l'étude de l'activité antioxydante des extraits obtenus à partir de l'espèce récoltée en Tunisie a montré que l'extrait méthanolique présente un fort pouvoir antiradicalaire avec une valeur IC_{50} de 15,58 mg/l. Tandis que, les extraits préparés avec de l'éther de pétrole ou le dichlorométhane ont présenté une activité antioxydante faible avec une valeur de 285,22 mg/l et 512,05 mg/l, respectivement. La CI_{50} de la vitamine C (contrôle positif) était 3,89 mg/l.

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté que l'activité antiradicalaire des extraits des plantes dépend de la quantité de composés polyphénoliques.

Des études menées par Es-Safi et ses collaborateurs, en 2005 [114], sur la même espèce poussant au Maroc, ont permis d'isoler un composé phénolique, le 6 hydroxy-lutéoline-7-O-laminaribioside, dont l'activité antioxydante est très importante $CI_{50} = 1,76$ mg/l. Le contrôle positif employé était le BHT (hydroxytoluène butylé) avec $CI_{50} = 8,81$ mg/l.

II. Étude de l'activité antimicrobienne de l'espèce *Globularia alypum*

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes, tel que les huiles essentielles, produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques. De nombreux travaux récents ont mis en évidence, *in vitro*, l'activité antimicrobienne de certaines huiles essentielles [115].

II.1. Principe

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie appelée antibiogramme ou méthode des disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé. Cette méthode permet d'évaluer l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle.

Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la souche à étudier. Après incubation, les colonies se développent, laissant des zones vierges autour des disques appelées zones d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit, plus la souche est résistante.

Dans cette partie nous allons étudier l'activité antimicrobienne de trois extraits (l'extrait méthanolique, l'extrait hexanique et l'extrait acétonique).

II.2. Protocole expérimental [116].

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé où les disques sont imbibés de 10 µl de chaque extrait.

II.2.a. Souches microbiennes testés

Les souches microbiennes testées ont été choisies pour leurs fréquences élevées : quatre souches bactériennes et deux souches fongiques ont été testées. Le tableau suivant représente le code des différentes souches microbiennes utilisées dans cette étude.

Tableau N° 17 : Codes des différentes souches microbiennes étudiées.

| Nature de souches | Souches utilisées | Code de la souche |
|----------------------|--------------------------------|-------------------|
| Souches bactériennes | <i>Bacillus ceureus</i> | ATCC 10876 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 |
| | <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 |
| Souches fongique | <i>Candida albicans</i> | ATCC 24433 |
| | <i>Aspergillus basiliennes</i> | ATCC 16404 |

II.2.b. Préparation des milieux de culture

Les milieux standards utilisés sont la gélose de Muller-Hilton stérile (MH) pour les bactéries et Sabouraud stérile (SAB) pour les levures et les champignons.

Les deux milieux ont été coulée dans des boites de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 3 à 4 mm répartie uniformément dans les boites. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

II.2.c. Préparation des disques

Les disques de 9 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120°C pendant 20 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait naturel à tester.

II.2.d. Préparation des dilutions d'extraits de *Globularia alypum*

Les extraits étudiés (EMé, EHx et EAn) ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour obtenir une concentration de 50 mg/ml.

II.2.e. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sontensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

II.2.f. Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et les disques wattman imprégnés de DMSO (témoin négatif).

Finalement, les boîtes de pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C pour les bactéries et 48h à 26°C pour les levures.

II.2.g. Lecture des antibiogrammes

Le diamètre de la zone d'inhibition autour de disque de papier imprégné a été déterminé à l'aide d'un pied à coulisse, pour les différents extraits.

* Résultats et discussion

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien de trois extraits obtenus à partir de l'espèce *Globularia alypum* (l'extrait méthanolique, l'extrait hexanique et l'extrait acétonique) par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons.

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis quatre souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus ceureus*) et deux souches fongiques (*Candida albicans*, *Aspergillus basiliennes*). Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux 18 et 19.

Tableau N° 18 : Diamètre des zones d'inhibitions (mm) des l'extraits (EMé, EHx et EAn) et d'ATB relatives aux différentes souches bactériennes.

| Gram | Souches bactériennes | Diamètre de la zone d'inhibition (mm) | | | |
|--------|--|---------------------------------------|-----|-----|-----|
| | | Cp | EMé | EHx | EAn |
| Gram + | <i>Bacillus ceureus</i> ATCC 10876 | 36 | 12 | 12 | 0 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | 35 | 0 | 12 | 13 |
| Gram - | <i>Pseudomonas aeroginosa</i> ATCC 27853 | 42 | 14 | 11 | 11 |
| | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 34 | 0 | 0 | 0 |

Cp = Ciprofloxacine

Tableau N° 19 : Diamètre des zones d'inhibitions (mm) des l'extraits (EMé, EHx et EAn) et des ATFs relatives aux différentes souches fongiques.

| Souches bactériennes | Diamètre de la zone d'inhibition (mm) | | | | |
|---|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | Mr | ApB | EMé | EHx | EAn |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 24433 | 16 | 0 | 10 | 10 | 0 |
| <i>Aspergillus basiliennes</i> ATCC 16404 | 17 | 13 | 0 | 0 | 0 |

Mr = Métronidazol, ApB = Amphotéricine

Les extraits sont classés selon leur activité antimicrobienne en fonction des diamètres d'inhibition, dans laquelle les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne sont hiérarchisés en quatre classes [117]:

- Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition (d) égale 28 mm.
- Modérément inhibitrice lorsque $28 \text{ mm} > d > 16 \text{ mm}$.
- Légèrement inhibitrice lorsque $16 \text{ mm} > d > 10 \text{ mm}$.
- Non inhibitrice lorsque $d < 10 \text{ mm}$.

Les résultats mentionnés dans les tableaux 18 et 19, sont représentés sous forme d'histogrammes dans les figures 24 et 25.

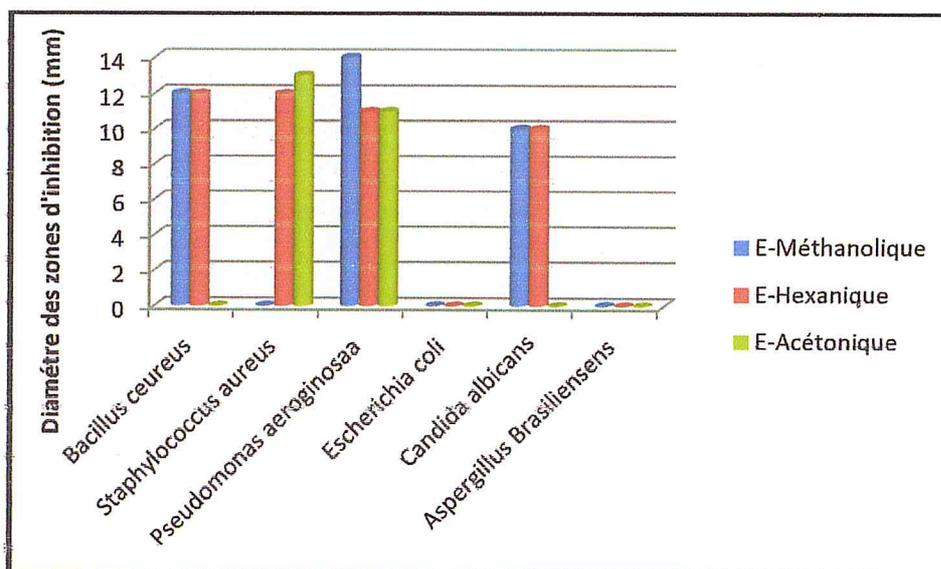


Figure 24 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibitions des extraits (EMé, EHx et EAn) relatives aux différentes souches microbiennes.

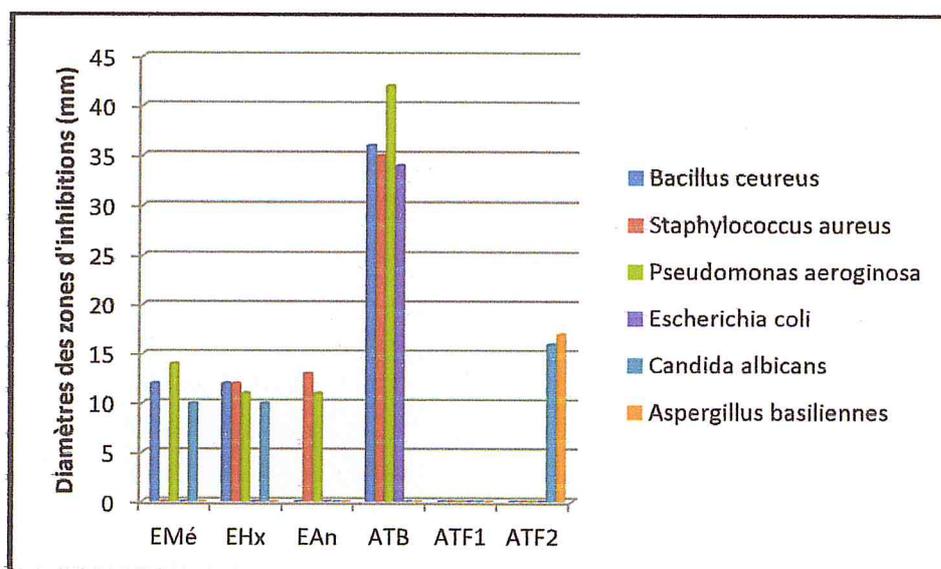


Figure 25 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibitions des extraits (EMé, EHx, EAn), de l'ATB et de l'ATF1 et ATF2 relatives aux différentes souches microbiennes.

Les résultats obtenus dans la figure 24, et en se référant à l'échelle de mesure, montrent une activité antimicrobienne variable pour les trois extraits sur les souches testées. D'après l'histogramme (Figure 24), pour l'extrait méthanolique la plus grande surface d'inhibition est observée dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 14 mm, suivi par *Bacillus ceureus* avec un diamètre d'inhibition de 12 mm. Alors que, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ont montré une résistance vis-à-vis cet extrait.

Tandis que, les résultats obtenus pour les souches antifongiques testées vis-à-vis cet extrait ont montré que la souche *Aspergillus Brasiliensis* est très résistante et que la souche *Candida albicans* est légèrement résistante (10 mm).

Pour l'extrait acétonique, la plus grande surface d'inhibition est observée dans le cas de *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 13 mm, suivi par *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 11 mm. Alors que, *Escherichia coli* et *Bacillus ceureus* ont montré une résistance vis-à-vis cet extrait.

D'autre part, les souches antifongiques *Candida albicans* et *Aspergillus Brasiliensis* ont révélé une résistance vis-à-vis cet extrait.

L'extrait hexanique est légèrement inhibiteur vis-à-vis les souches bactériennes à gram +, le plus grand diamètre étant de 12 mm contre *Bacillus ceureus* et *Staphylococcus aureus*. Pour les autres souches testées de gram - ont données des zones d'inhibitions moins importantes que les grams +, c'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 11 mm. Alors que, *Escherichia coli*, a montré une résistance vis-à-vis cet extrait.

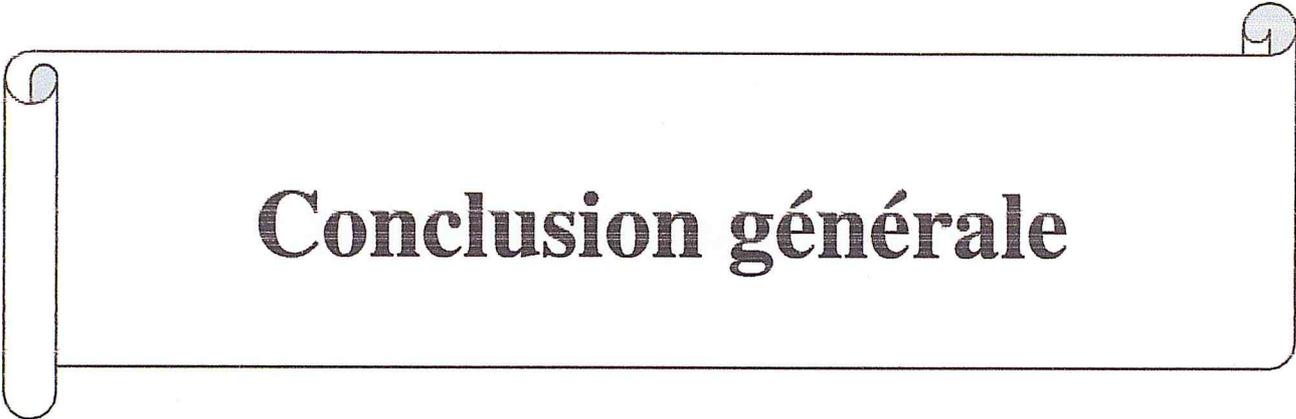
Par ailleurs, les résultats de l'activité antifongique de cet extrait ont montré que la souche *Aspergillus Brasiliensis* est très résistante et que la souche *Candida albicans* est légèrement résistante (10 mm).

D'après l'histogramme représenté dans la figure 25, la ciprofloxacine a une action inhibitrice sur la croissance de toutes les souches bactériennes testées et on constate que la souche *Escherichia coli* est moins sensible à l'antibiotique par rapport aux autres souches.

Par contre, toutes les souches antifongiques sont résistantes vis-à-vis le Métronidazol et légèrement résistantes vis-à-vis l'Amphotéricine B.

En conclusion, les trois extraits testés présentent une activité vis-à-vis la souche *Pseudomonas aeruginosa* et ils ne sont pas actifs vis-à-vis la souche *Escherichia coli*. Tandis que l'extrait acétonique ne présente aucune activité vis-à-vis les souches fongiques (*Candida albicans* et *Aspergillus Brasiliensis*).

Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature [118], car une étude de l'activité antimicrobienne effectuée sur des extraits obtenus à partir des parties aériennes de l'espèce *Globularia alypum* a révélé que ces extraits (l'extrait méthanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle) possèdent un pouvoir antimicrobien important vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Tandis que tous les extraits étudiés n'étaient pas actifs vis-à-vis les deux souches *Escherichia coli* et *Aspergillus Brasiliensis*.

A decorative border resembling a scroll, with a black outline and a light blue-grey shaded area. The border has rounded corners and a small circular detail at the top right corner.

Conclusion générale

Conclusion générale

La découverte de ressources naturelles du règne végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

Ce travail a porté sur l'étude de l'espèce *Globularia alypum* récoltée dans la région de Blida. Cette espèce appartient à la famille *Globulariaceae*, une des familles les plus importantes dans la flore algérienne et les plus utilisées en médecine traditionnelle. Cette étude a permis de mettre en évidence à travers un criblage phytochimique la présence des flavonoïdes, des tanins, des terpènes, des coumarines et des saponines.

L'analyse par chromatographie sur couche mince des extraits obtenus ainsi que le screening phytochimique, ont montré la présence de certaines classes de métabolites secondaires, tels que les flavonols et les flavones.

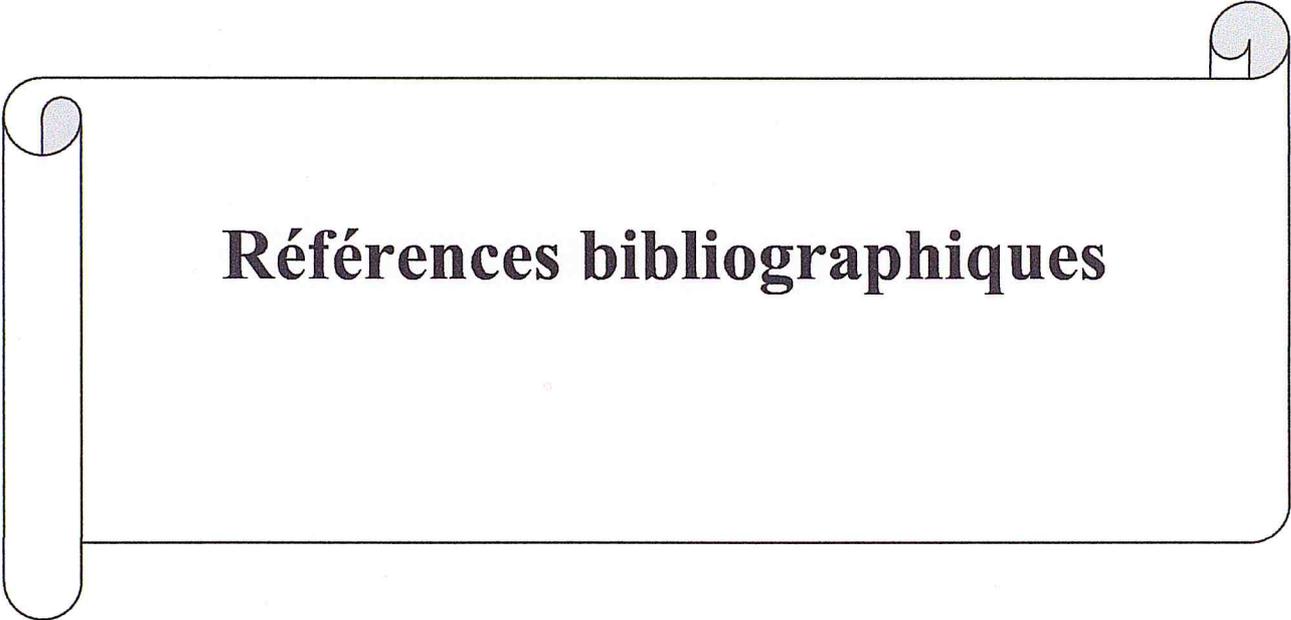
Le dosage des phénols totaux, a été réalisé par la méthode de Folin et Ciocalteu. La teneur la plus élevée des polyphénols est constatée dans l'extrait d'acétate d'éthyle (50 mg/g), suivi par l'extrait méthanolique (42 mg/g), puis par l'extrait acétonique (14 mg/g).

L'analyse de l'huile essentielle de l'espèce *Globularia alypum* obtenue par hydrodistillation a montré que cette huile est majoritairement composée de phytol (11.104%) et de (+) spathulénol (7.031%).

Le potentiel antiradicalaire des extraits a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que ces extraits possèdent une bonne activité.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien a été réalisée par la méthode de diffusion de disque. Les résultats obtenus montrent que tous les extraits testés sont actifs vis-à-vis de la souche *Pseudomonas aeruginosa* et inactifs vis-à-vis des souches *Escherichia coli* et *Aspergillus basiliennes*.

En fin et d'après cette étude l'espèce *Globularia alypum* est riche en métabolites secondaires, une exploitation de leurs propriétés antioxydante et antimicrobienne implique une recherche plus poussée de ses principes actifs.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Svoboda, K., Svoboda, T. (2000). Secretory structures of aromatic and medicinal plants Microscopix publications, Scotland. 60 p.
2. Marc, T., Gerard, W., Denis, L. (2001). Classification des anti-inflammatoires. In Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4^{ème} Éd, publication universitaire. 126-128 p.
3. Muanda, N.F., Koné, D., Dicko, A., et al. (2009). Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian medicinal plant parts, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 3: 147-160 P.
4. Gaussen, H., Leroy, H.F. (1982). Précis de botanique, végétaux supérieurs. Masson. Paris. 124-129 p.
5. Le Maout, E., Decaisne, J. (1868). Traité général de botanique descriptive et analytique, 211 p.
6. Sambamurty, A. V. S. S. (2005). Taxonomy of Angiosperms, 2^{ème} Éd, 682 p.
7. Planchon, G. (1859). Des *Globulaires* au point de vue botanique et médicinal, 9^{ème} Éd, 246 p.
8. Elbetieha, A., Oran, S.A., Alkofahi, A., Darmani, H., Raies, A.M. (2000). J. Ethnopharmacol. 72: 215-219.
9. Le Floc'h, E. (1983). Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Programme Flore et Végétation tunisienne. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, Tunis, Tunisia.
10. Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, Centre National de la Recherche Scientifique. 797- 860.
11. Mateos, A., Vald, B. (2006). A new species of *Globularia* (*Globulariaceae*) from the Talassemtane National Park. N. Morocco. 36(1): 409-412.
12. Duran, A., Çetin, Ö., Öztürk, M. (2009). *Globularia anatolica* sp. Nov. (*Globulariaceae*) from the Honaz Mountain National Park, southwest Turkey, Nordic Journal of Botany. 27: 232-237.
13. Conti, F., Abbate, G., Alessandrini, A., Blasi, C. (Eds.). (2005). An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora. Palombi editori, Roma. 428 p.
14. Edmondson, J.R. (1982). In Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Éd. P. H. Davis, University Press, Edinburgh. Vol. 7, 27 p.
15. Baytop, T. (1984). Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present), Istanbul University Publications, _Istanbul .No. 3255, 419 p.

16. Victoria, H., Merad, R., Azouz, M. (2013). Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Éd springer, phytothérapie-pratique.
17. Lazrek, H.B., Jaouhrai, J.T, Seddik, A., Jana, M. (1994). Évaluation de l'effet hypoglycémiant de dix plantes réputées anti-diabétiques dans la wilaya de Marrakech (Maroc). Acte du 1^{er} colloque international «La pharmacopée arabo-islamique, hier et aujourd'hui». 231-243.
18. Ziyat, A., Legssyer, A., Mkhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. J Ethnopharmacol.58: 45-54.
19. Jouad, H., Maghrani, M., Eddouks, M. (2002). Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L., and *Globularia alypum* L. In normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol. 81: 351-356.
20. Skim, F., Kaaya, A., Jaouhari, J.T., Lazrek, H.B., Jana, M., El-Amri, H. (1999). Hypoglycaemic activity of *Globularia alypum* leaves in rats. Fitoterapia. 70: 382-389.
21. Lallemand, M. (1973). Contribution à l'étude de la feuille de *Globulaire*. Thèse d'État en Pharmacie, Marseille.
22. Bello, R., Moreno, L., Primo-Yufera, E., Esplugues, J. (2002). *Globularia alypum* L. Extracts reduced histamine and serotonin contraction *in vitro*. Phytother Res. 16: 389-392.
23. Es-Safi, N.E., Khlifi, S., Kerhoas, L., Kollmann, A., El-Abbouyi, A., Ducrot, P.H. (2005). Anti-oxidant constituents of the aerial parts of *Globularia alypum* L growing in Morocco. J Nat prod. 68: 1293-1296.
24. Caldes, G., Prescott, B., King, J.K. (1975). Potential anti-leukemic substance present in *Globularia alypum*. Planta Med. 27: 72-76.
25. Graham, J.G., Quinn, M.L., Fabricant, D.S., Fransworth, N.R. (2000). Plants used against cancer-an extension of the work of Jonathan Hartwell. J Ethnopharmacol. 73: 347-377.
26. Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., Younos, C. (1991). J. Ethnopharmacol. 35: 123-143.
27. Allali, H., Benmehdi, H., Dib, M.A., Tabti, B., Ghalem, S., Benabadji, N. (2008). Phytotherapy of diabetes in west Algeria. Asian Journal of Chemistry. 20(4): 2701-2710.
28. Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Goto, K., Ikeshiro, Y. (1991). J. Ethnopharmacol. 35: 191-196.

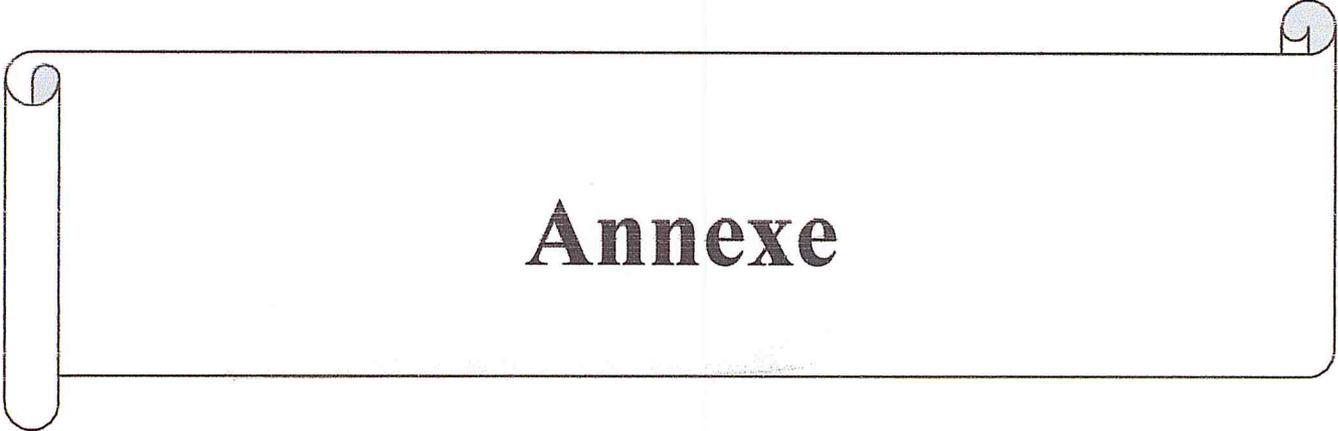
29. Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Loizzo, M.R., Conforti, F., Statti, G., Pirisi, F.M., Menichini, F. (2012). Antioxidant and Anti-cholinesterase Activity of *Globularia meridionalis* Extracts and Isolated Constituents. NPC. Natural Product Communications. Vol. 7. No. 8:1015 -1020.
30. Çaliş, I., Kirmizibekmez, H., Heinz, R., Sticher, O. (1999). J. Nat. Prod. 62: 1165-1168.
31. Çaliş, I, Kirmizibekmez, H., Sticher, O. (2001). J. Nat. Prod. 64 (1): 60-64.
32. Çaliş, I., Kirmizibekmez, H., Tasdemir, D., Sticher, O. (2002a). Zeitschrift für Naturforschung. 57c: 591-596.
33. Çaliş, I., Kirmizibekmez, H., Tasdemir, D., Ireland, C.M. (2002b). Chem. Pharm. Bull. 50: 678–680.
34. Hannebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie. Springer-Verlag. 1: 3-6.
35. Gee, J., Johnson, I.T. (2001). Polyphenolic compounds: interaction with the gut and implication for human breath. Medicinal chemistry. 8:1-36.
36. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Éd Presses polytechnologiques et universitaires romandes. 4-5 p.
37. Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de Cardiologie et d'Angéiologie. 51: 304-315.
38. Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Therapeut. 96: 67-202.
39. Bahorun, T. (1997). Substances naturelles activités : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Univ. Maurice.
40. Nathalie, R.G. (2001). Le médecin du Québec. Vol, 36(4).
41. Richter, G. (1993). Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie). Presses polytechniques et universitaires romandes. Lansanne CH-1015.
42. Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc. Lavoisier 3ème Éd. Paris. 1120 p
43. Harborne, J.B., Williams, A.C. (1971). 6-Hydroxyluteolin and Scutellarein phyletic markers in higher plants*. Phytochemical Unit, Dept. of Botany, University of Reading. Vol (10), 367-378.

44. Kirmizibekmez, H., Bassarello, C., Piacente, S., Akaydin, G., Çaliş, I. (2009). Flavonoid, Phenylethanoid and Iridoid Glycosides from *Globularia aphyllanthes*. Z. Naturforsch. 64b: 252 -256.
45. Kirmizibekmez, H., Çaliş, I., Piacente, S., Pizza, C. (2004a). Turk. J. Chem. 28: 455-460.
46. Friščić, M., Bucar, F., Hazler Pilepić, K. (2016). LC-PDA-ESI-MS analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia spp.* J. Mass Spectrom. 51: 1211-1236.
47. Kirmizibekmez, H., Akbay, P., Sticher, O., Çaliş, I. (2003b). Zeitschrift für Naturforschung C. 58: 181-186.
48. Klimek, B. (1988). Phytochemistry. 27(1): 255-258.
49. Georgiev, M.I., Alipieva, K., Orhan, I., Abrashev, R., Denev, P., Angelova, M. (2011). Antioxidants and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb and its Phenylethanoid glycosides. Food Chem. 128: 100-105.
50. Jiménez, C., Riguera, R. (1994). Phenylethanoid glycosides in plants: Structure and biological activity. Nat. Prod. Rep. 11, 591-606.
51. Qu, H., Zhang, Y., Chai, X., Sun, W. (2012). Isoforsythiaside, an antioxidant and antibacterial phenylethanoid glycoside isolated from *Forsythia suspensa*. Bioorg. Chem. 40: 87-91.
52. Carrillo-Ocampo, D., Bazaldúa-Gómez, S., Bonilla-Barbosa, J.R., Aburto-Amar, R., Rodríguez-López, V. (2013). Anti-inflammatory activity of iridoid and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. Molecules. 18: 12109-12118.
53. Si, C.L., Shen, T., Jiang, Y.Y., Wu, L., Yu, G.J., Ren, X.D., Xu, G.H., Hu, W.C. (2013). Antioxidant properties and neuroprotective effects of isocampneoside II on hydrogen peroxide-induced oxidative injury in PC12 cells. Food Chem. Toxicol. 59: 145-152.
54. Morikawa, T., Pan, Y., Ninomiya, K., Imura, K., Matsuda, H., Yoshikawa, M., Yuan, D., Muraoka, O. (2010). Acylated phenylethanoid oligoglycosides with hepatoprotective activity from the desert plant *Cistanche tubulosa*. Bioorg. Med. Chem. 18: 1882-1890.
55. Andary, I.R.K., Ibrahim, Z. (1986). Naturforsch. C. 41c, 18.
56. Kirmizibekmez, H., Bassarello C, Piacente S, Calis I. (2008). Phenylethyl glycosides from *Globularia alypum* growing in Turkey. Helvetica Chimica Acta. 91: 1525-1532.
57. Kirmizibekmez, H., Çaliş, I., Piacente, S., Pizza, C. (2004b). Helvetica Chimica Acta. 87: 1172-1179.
58. Jensen, S.R., Schripsema, J. (2002). Chemotaxonomy and pharmacology of *Gentianaceae*, L & Albert. V. Eds. Cambridge University Press. 573-584.

59. Evan, W.C., Trease, Evan. (2002). Pharmacognosy. 15^{ème} Éd. W. B. Samders Company Limited.
60. Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie Phytochimie Plantes Médicinales, 4^{ème} édition; Tech & Doc: Paris.
61. Jensen, S. R., Franzyk, H., Wallander, E. (2002). Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry*. 60: 213-231.
62. Bianco, A. (1990). The Chemistry of Iridoids" in "Studies in Natural Products Chemistry, Attaur-Rahman Ed. Elsevier Science Publishers. Vol 7: 329. Amsterdam.
63. Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C. (2000). PDR for Herbal Medicine, Medical Economics Company, Montlave.
64. Graikou, K., Aligiannis, N., Chinou, I.B., Harvala, C.Z. (2003). *Naturforsch.* Vol (57) C: 95-99.
65. Hamdi, H.K., Castellon, R. (2005). *Biochemical and Biophysical Research communications*. Vol(334): 769-788.
66. Raju, B.L., Lin, S.J., Hou, W.C., Lai, Z.Y., Liu, P.C., Hsu, F.L. (2004). *Natural product Research*. Vol 18(4): 357-364.
67. Baruah, C.C., Gupta, P.P., Nath, A., Patnaik, L.G.K., Dhawan, B.N. (1998). *Pharmacological Research*. Vol 38(6).
68. Tundis, R., Loizzo, M.R., Menichini, F., Statti, G.A., Menichini, F. (2008). Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Mini Rev. Med. Chem.* 8: 399-420.
69. Naruto, M., Ohno, K., Naruse, N., Takeuchi, H. (1979). *Tetrahedron Lett.* 251.
70. Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*, 2nd Éd, John Wiley and Sons.
71. Taskova, R.M., Gotfredsen, C.H., Jensen, S.R. (2006). *Phytochemistry*. 67: 286-301.
72. Kenzel, H. (1970). *Stummerer-Schmid. Phytochemistry*. 9(10): 2237-2239.
73. Chadhuri, R.K., Sticher, O. (1980). *Helvetica Chimica Acta*. 63(1): 117-120.
74. Kirmizibekmez, H., Çaliş, I., Akbay, P., Sticher, O. (2003a). *Zeitschrift für Naturforschung C*. 58: 337-341.
75. Amer, M., Elmasry, S. (1988). *Alexandria Journal of Pharmzaceutical Sciences*. 2(2): 153-155.
76. Chadhuri, R.K., Salama, O., Sticher, O. (1981). 236. Iridoid and Aryl Glucosides from *Globularia nudicaulis* and *Globularia nana*. *HELVETICA CHIMICA ACTA*. Vol(64): 2401-2404

77. Endo, T., Tagushi, H. (1973). Chem. Pharm. Bull. 21: 2684-2688.
78. Bozin, B., Nimica-Dukiv, N., Simin, N., Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. J. Agric. Food chem. 54: 1822-1828.
79. Crkvenčić, M., Dudaš, S., Jerković, I., Marijanović, Z., Poljuha, D., Pilepić, K.H. (2016). Essential oil composition of three *Globularia species*. Chem. Biodiversity. 13: 219-223.
80. Beniston, N.T., Beniston, W.S. (1984). Fleurs d'Algérie. E. N. L. Alger.
81. Ozenda, P. (1958). Flore du Sahara. CNRS, éd. Paris. France.
82. Polunin, O., Huxley, A. (1967). Fleurs du Bassin méditerranéen. Fernand Natan éd. Paris. 221 p.
83. Balansard, J., Delphant, J. (1948). La *globulaire*: un purgatif oublié. Revue de Phytothérapie. 12: 213-234.
84. Ben-hji, Ghrabi, Z., Zouaghi, M. (2007). Biodiversity valorization of medicinal plants and ethno botanical study of the flora of southwestern Kef (Tunisia). Ethnopharmacologia. 39: 36-43.
85. Ben-hji, Zouaghi, M., Ghrabi, Z. (2011). Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants in Northwest Tunisia. Curare. J. Med. Anthropol. 34(1+2): 16.
86. Chaudhuri, R.K., Sticher, O. (2004). New iridoid glycosides and a lignin diglucoside from *Globularia alypum* L. Helvetica Chimica acta. 64(1): 3-15.
87. Kirmizibekmez, H., Piacente, S., Bassarello, C., Çaliş, I. (2007). New phenylethanoid glycosides from *Globularia alypum* L. Planta Med. 73.
88. Liusia, J., Penuelas, J., Alessio, G.A., Estiarte, M. (2006). Seasonal contrasting changes of foliar concentrations of Terpene and other volatile organic compound in four dominant species of a Mediterranean shrubland submitted to a field experimental drought and warming. Physiologia Plantarum. 127(4). 632-649.
89. Valnet, J. (1983). Phytothérapie : Traitement des maladies par les plantes. Maloine. S.A, éd. Paris. 5ème Éd. 63 p.
90. Ben hassine, B., Bui, A., Mighri, Z. (1982). Journal de la Société Chimique de Tunisie. 7: 3-10.
91. J. V. Sanchez, J.V. (1933). Anales soc. Espan. Fis quim. 31: 361-363.
92. Bernard, P., Lallemand, M.M., Blansard, G. (1974). Plantes médicinales et phytothérapie. 8(3) : 174-179.

93. Es-Safi NE1, Khelifi, S., Kollmann, A., Kerhoas, L., EL Abbouyi, A. (2006). Ducrot pH. Chem Pharm Bull (Tokyo). Jan. 54(1): 85-88.
94. Chadhuri, R.K., Sticher, O. (1981). 1. New Iridoid Glucosides and a Lignan Diglucoside from *Globularia alypum* L. Helvetica Chimica acta. Vol(64): 3-15.
95. Ramdani, M., Lograda, T., Ounoughi, A., Chalard, P., Figueredo, G., Laidoudi, H., El-Kolli, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial activity and chromosome number of *Globularia alypum* from Algeria. Int. J. Curr. Microbial. App. Sci. 3(7): 306-318.
96. Markham, K.R. (1982). Technique of flavonoids identification. London Academic Press. Chap1 & 2: 1-113.
97. Raaman N. (2006). Phytochemical techniques. New India Publishing.
98. Karumi, Y., Onyeyili, P.A., Ogugbuaja, V.O. (2004). Identification of active principals of balsamina (Balsam apple) leaf extract. J. Med. Scien. 4: 179-182.
99. Edeoga, H.O., Okwu, D.E., Mbaebie, B.O. (2005). African J. Biotechnol. 4(7): 685-688.
100. Rizk A.M. (1982). Fitoterapia. 52: 35-42.
101. Taghzouti, O.K., Balouiri, M., Ouedrhiri, W., Chahad, A.E., Romane, A. (2016). In vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of *Globularia alypum* L. extracts. J. Mater. Environ. Sci. 7(6): 1988-1995.
102. Harzallah, H.J., Neffati, A., Skandrani, I., Maaloul, E., Chekir, L., Mahjoub, T. (2010). J. Med. Plants. 4: 2048.
103. Folin O., Ciocalteu V. (1927). J. Biol. Chem.73: 627.
104. Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, M., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P. (1972). Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et contrôle des vins. Éd. Dunod. Paris. 671 p.
105. Boussoualim, N., Trabsa, H., Krache, I., Arrar, L., Baghiani, A. (2016). Kinetics of inhibition of xanthine oxidase by *Globularia alypum* and its Protective Effect against Oxonate-Induced Hyperuricemia and Renal Dysfunction in Mice. Journal of applied pharmaceutical science. 6(4): 159-164.
106. Burgot, G., Burgot, J.L. (2002). Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales », édition Tec & Doc. Paris. France
107. Markham, K.R. (1982). Techniques of flavonoids identification. Academic press. London. 144 p.
108. Guinebert, E., Durand, P., Prost, M., Grinand, R., Bernigault R. (2005). Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole. 554-558.



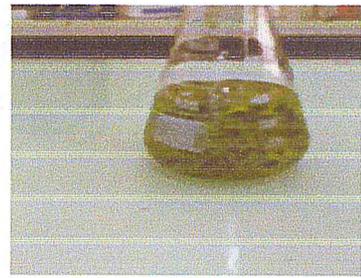
Annexe

Annexe 1

- **Macération**



Macération dans le méthanol



Macération dans l'hexane

Annexe 2

- **Extraction liquide-liquide**



Extraction liquide-liquide avec l'hexane



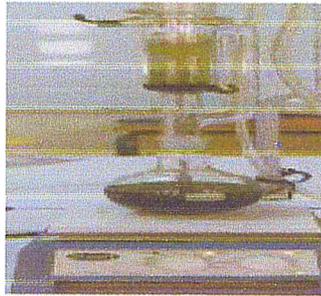
Extraction liquide-liquide avec chloroforme



Extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle

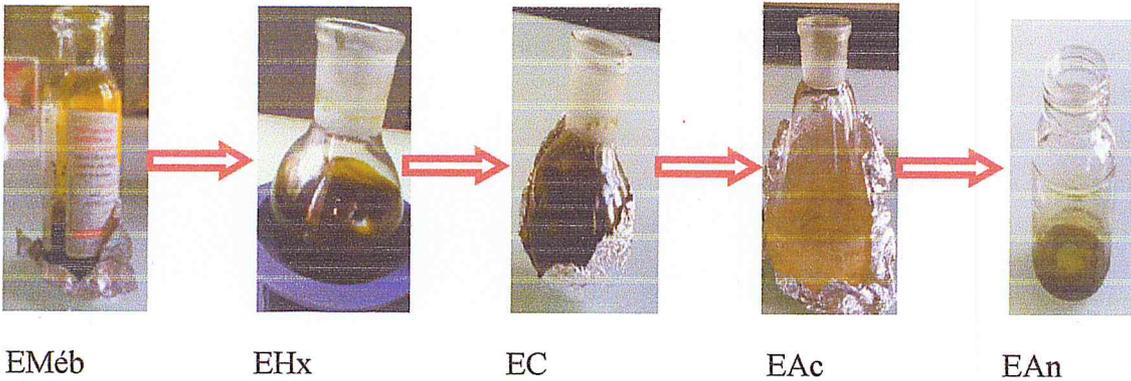
Annexe 3

- Extraction par soxhlet



Annexe 4

- Différents extraits de la plante *Globularia alypum*



Annexe 5

- Criblage phytochimique



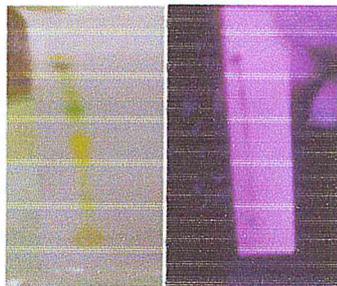
Annexe 6

- Dosage des polyphénols totaux

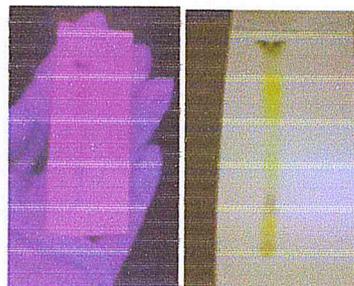


Annexe 7

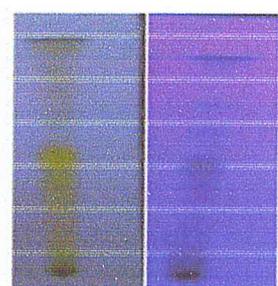
- Chromatographie sur couche mince (CCM).



EMeb



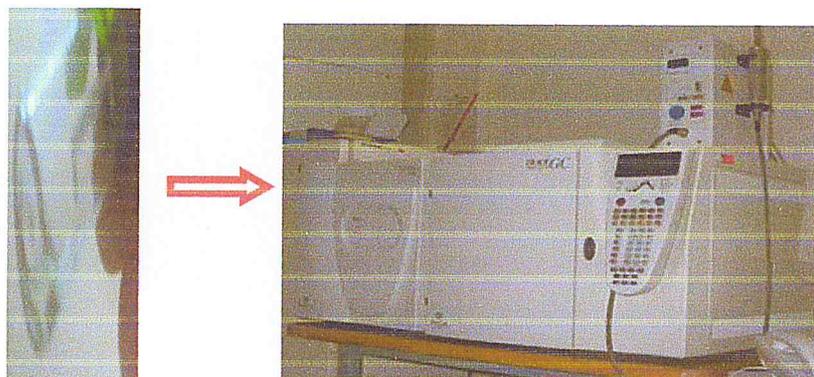
EAc



EAn

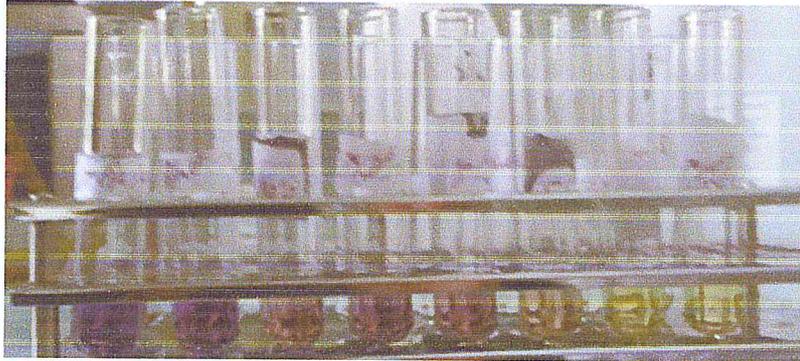
Annexe 8

- Extraction et analyse de l'huile essentielle



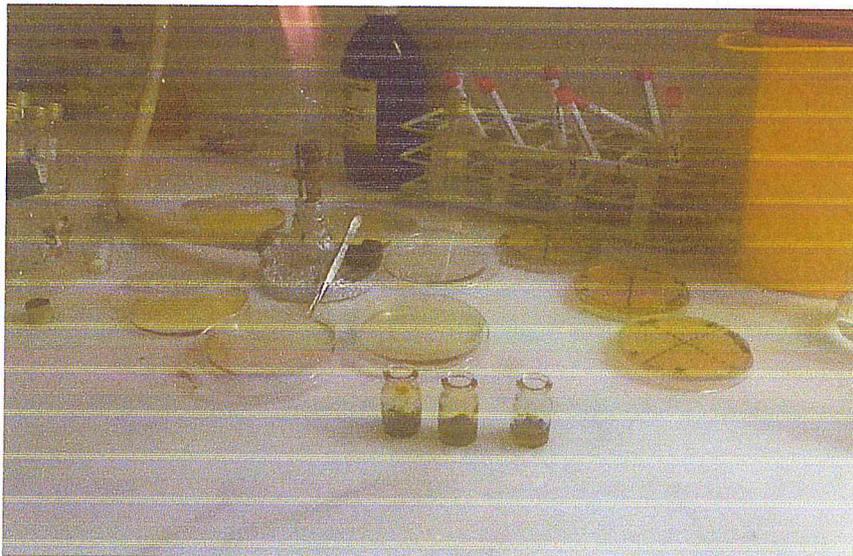
Annexe 9

- Le changement de la couleur de la solution méthanolique de DPPH en présence des extraits à tester (du violet à jaune)



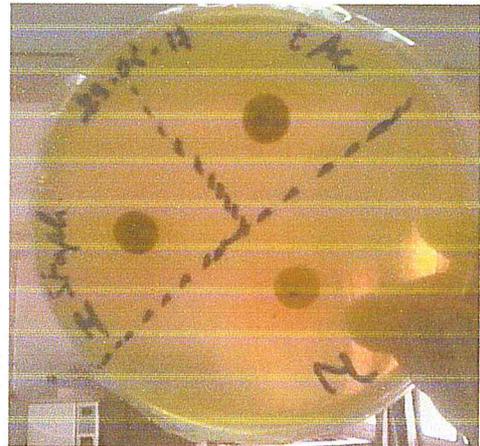
Annexe 10

- Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait méthanolique, hexanique et acétonique de *Globularia alypum*.

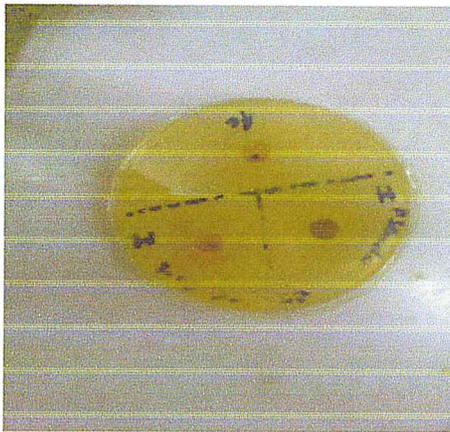




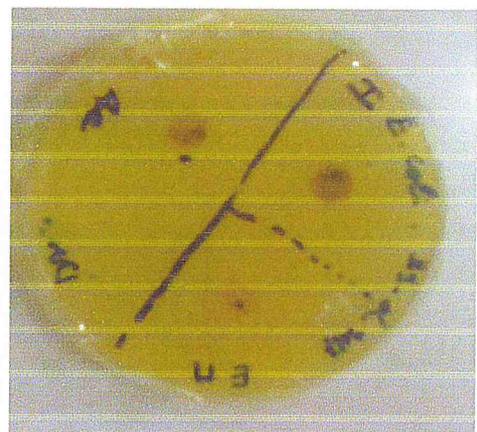
Bacillus ceureus



Staphylococcus aureus



Pseudomonas aeruginosa



Escherichia coli



Candida albicans



Aspergillus Brasiliensis

