

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire /Biologie Moléculaire des Procaryotes

**Thème : Effets biologiques des composés phénoliques de deux plantes
médicinales**

(Globularia alypum et Lavandula stoechas)

Présenté par :

- BOUCHEBRINE Walid
- CHEGHIB Abdallah
- MEFTAH Rabie

Devant le jury composé de :

Présidente :	Mme AYED. H	(M.A.A)	Université de Guelma.
Encadreur :	Mme HAMDIKEN. M	(M.A.A)	Université de Guelma.
Examinatrice :	Mme BOUSSAADIA. M.I	(M.A.A)	Université de Guelma.

Juin 2015

Nos remerciements, d'abord à Dieu « الله » le tout puissant pour la volonté, la santé, et la patience qu'il nous a donné durant toutes ces années.

On tient à remercier sincèrement Madame Hamdikan Malika, qui en tant que Directrice de recherches, s'est toujours montrée à l'écoute tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous remercierons également les membres de jury M^{me} AYED.H et M^{me} BOUSSAADIA.M.I qui nous ont fait L'honneur de juger notre travail.

On tient à remercier maintenant très respectueusement techniciennes des laboratoires Ratiba, Ghania, Asma, Hadia ,wafa et Houria pour nous avoir soutenus durant notre période de travail au laboratoire de l'université de Guelma ainsi les qui nous ont facilité notre travail.

Nous remercierons également nos camarades de Master II pour leurs conseils et leurs idées.

Nous sommes redevables à L'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre Formation durant ces 05 dernières années.

On tient à exprimer nous reconnaissance envers nos parents pour leur contribution, leurs encouragements et leurs patiences.

Enfin, nous adresse nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Synthèse bibliographique	
Chpitre I : La Phytothérapie	3
1. Définition	3
2. Origine des plantes médicinales	3
3. Aspects préparatoires à l’usage médical	4
3.1. Les Poudres.....	5
3.2. Les Extraits	5
3.3. Teintures	5
3.4. Alcoolatures	5
3.5. Alcoolats	5
3.6. Huiles essentielles (HE).....	5
3.7. Hydrolats.....	6
4.Eléments actifs des plantes médicinales	6
4.1. Saponines (ou saponosides)	6
4.2. Flavonoïdes	6
4.3. Anthocyanes (ou anthocyaniques).....	6
4.4. Mucilages.....	7
4.5. Les Vitamines	7
4.6. Tanins.....	7
4.7. Alcaloïdes	7
5. Domaines d'application des plantes médicinales	7
5.1. En médecine.....	8
5.2. En agriculture.....	8
5.3. En alimentation	8
5.4. En cosmétique.....	9
Chapitre II : Les plantes sélectionnées	10
1. <i>Globularia alypum</i>	10
1.1. Habitat et description.....	10
1.2. Identité botanique	11
1.3. principes actifs majeurs	11
1.4. usage traditionnel et courant	11
2. <i>Lavandula stoechas</i>	12
2.1. Habitat et description.....	12

2.2. Identité botanique	13
2.3. principes actifs majeurs	13
2.4. Usages traditionnels et courants	14
Chapitre III : Activité antioxydante et antibactérienne	15
1. Activité antioxydante	15
1.1. Définition des antioxydants	15
1.2. Les antioxydants primaires	15
1.3. Les antioxydants secondaires.....	15
1.4. Définition d'un radical libre	16
1.5. Principaux radicaux libres	16
1.6. Les sources de production des radicaux libres.....	17
1.7. Stress oxydant	18
1.7.1. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif.....	18
1.7.2. Implications pathologiques du stress oxydatif.....	18
2. Activité anti microbienne	18
2.1. Les agents anti microbiens.....	18
2.2 Mode d'action des agents antimicrobiens	19
2.3. Action germicide.....	19
2.4. Action germistatique (bactériostatique et fongistatique).....	18
2.5.Types d'agents antimicrobiens	19
2.5.1. Agents physiques	19
2.5.2. Agents chimiques.....	20
2.5.3. Agents chimio thérapeutiques.....	20
2.6. Détermination de l'activité antimicrobienne	21
2.6.1. Notion de germe test.....	21
2.6.2. Détermination des doses actives d'un agent antimicrobien	21
2.6.3. Méthode des porte-germes	21
2.6.4. Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides.....	21
Partie expérimental	
Matériel et méthodes	22
1. Récolte du matériel végétal	22
2. Etude phytochimique	22
2.1. Tests préliminaires de la composition chimique.....	22
2.1.1. Les Alcaloïdes.....	22
2.1.2. Coumarines	23
2.1.3. Tanins.....	23
2.1.4. Flavonoïdes.....	24

2.1.5. Saponosides	24
2.1.6. Mucilages.....	25
2.2. Préparation de l'extrait méthanolique.....	25
2.3.1. Dosage des polyphénols.....	28
2.3.2. Dosage des flavonoïdes	29
3. Séparation et identification par chromatographie sur couche mince.....	30
4. Evaluation de l'activité anti-oxydante	31
5. Tests microbiologiques	32
5.1. Les souches bactériennes	32
5.2. Milieux de culture utilisés.....	33
5.3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	33
5.3.1. Préparation des suspensions bactériennes	33
5.3.2. Ensemencement	34
5.3.3. Test du méthanol ou contrôle négatif.....	34
5.3.4. Antibiogramme ou contrôle positif	34
5.3.5. Méthode de diffusion en milieu gélosé ou aromatoigramme	35
Résultats et Discussion	37
1. Résultats de l'étude phytochimique.....	37
1.1. Tests préliminaires de la composition chimique.....	37
1.2. Rendement de l'extraction	39
1.3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	41
1.4. Résultats de la CCM	42
2. Evaluation de l'activité antioxydante (DPPH).....	48
3. Résultats de l'activité antibactérienne	50
3.1. Test du méthanol (test négatif)	50
3.2. Antibiogramme	51
3.3. Test de l'activité antibactérienne des extraits de <i>Globularia alypum</i> et <i>Lavendula stoechas</i> sur les souches testées méthode des disques (aromatoigramme). 54	
3.3.1. Effet antibactérien des extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	54
3.3.2. Effet antibactérien des extraits sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	56
3.3.3. Effet antibactérien des extraits sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	57
3.3.4. Effet antibactérien des extraits sur <i>Salmonella spp</i>	59
Conclusion	62
Références bibliographiques	
Annexes	

Notre travail porte sur l'étude de la phytochimie et des activités antioxydantes et antibactériennes de deux plantes médicinales, *Globularia alypum* (tasselgha) et *Lavandula stoechas* (El halhal).

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence des Saponosides, des Tanins, des flavonoïdes, des Mucilages et des Coumarines avec une absence des Alcaloïdes chez les deux plantes.

L'évaluation quantitative des composés phénoliques par la méthode de Folin à montré que la quantité de polyphénols dans l'extrait méthanolique *Lavandula stoechas* 95mg EAG/g extrait est plus importante que celle de *Globularia alypum* 84 mg EAG/g extrait.

Le dosage des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium a révélé 30.85mg EQ/g extrait pour *Globularia alypum* contre 20,4mg EQ/g extrait pour *Lavandula stoechas*.

L'analyse qualitative par la chromatographie sur couche mince a révélé l'existence des différentes classes et composés des flavonoïdes chez les deux plantes.

Les deux extraits méthanoliques ont montré un pouvoir antiradicalaire piégeant le radical libre DPPH, avec IC₅₀ de 0,42 mg/ml pour EMGA et 0,45 mg/ml pour EMLS.

L'effet antibactérien a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton, pour les bactéries-testées *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats ont montré que l'extrait méthanolique de *Globularia alypum* et *Lavandula stoechas* n'ont présenté aucune activité antibactérienne vis-à-vis les quatre souches testées.

Mots clés : plantes médicinales, extrait méthanolique, activité antioxydante, DPPH, activité antibactérienne.

Our work is around the study of the phytochemistry, also antioxydant and antibacterial activities of two medicinal plants, *Globularia alypum* (tasselgha) and *Lavandula stoecha* (El halhal).

The phytochemical screening permitted us to bring out the presence of the Saponosides, the Tannins, the Flavonoïdes, Mucilages and the Coumarines with lack of Alcaloïdes in the two plants.

The quantitative evaluation of the phenolic compounds by the Folin method has showed that the quantity of the polyphenols in the methanolic extract of *Lavandula stoechas* 95mg GAE / g extract is more important than the one of *Globularia alypum* 84 mg GAE / g extract .

The flavonoids dosage by the aluminium trichloride's method has revealed 30,85mg QE / g extract for *Globularia alypum* against 20, 4 mg QE / g extract for *Lavandula stoechas*.

The qualitative analysis by the chromatography on a thin layer revealed Different classes and compounds of flavonoids in both plants.

Both of methanolic extracts has shown an antiradical power trapping the free radical DPPH, with IC₅₀ of 0,42mg / ml for the methanolic extract of *Globularia alypum* and 0,45mg / ml for the methanolic extract of *lavandula stoechas*.

The antibacterial effect has been determined by the method of diffusion on gelose Mueller-Hinton for the bacterium-tests *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The results bring out that the both of methanolic extract of *Globularia alypum* and *lavandula stoechas* had presented no activity next to the four bacterias.

Key words: medicinal plants, methanolic extract, antioxydant activity, DPPH, antibacterial activity.

AA : Acide Ascorbique.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

ATB : Antibiotique.

BAW : Butanol/Acétone/Water.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CMB : Concentration Minimal Bactéricide.

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice.

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl.

EAG/g d'extrait : équivalent acide gallique par gramme d'extrait.

EC₅₀ : Efficient Concentration 50%.

EMGA : Extrait Méthanolique de *Globularia Alypum*.

EMLS : Extrait Méthanolique de *Lavandula Stoechas*.

EQ/g d'extrait : équivalent quercétine par gramme d'extrait.

FeCl₂ : Chlorure Ferrique.

GA : *Globularia Alypum*.

GN : Gélose Nutritive.

H₂SO₄ : Acide Sulfurique.

HCL : Acide chlorhydrique.

HE : Huile Essentielle.

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice de 50 %.

LS : *Lavandula Stoechas*.

MH : Mueller Hinton.

MoO₄⁻² : phosphomolybdic.

Na₂CO₃: Carbonate de Sodium.

NaOH: Hydroxyde de Sodium.

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase.

NH₄OH: Hydroxyde d'ammonium.

PBP: Penicillium Binding Protein.

RF : Rapport Frontal.

RL : Radicaux Libres.

WO₄⁻² : phosphotungstic.

عملنا يركز على دراسة المادة الكيميائية النباتية المضادة للأكسدة ومضادات البكتيريا لنوعين من النباتات

الطبية : *Lavandula stoechas* و *Globularia alypum* والحلال

كشفت الفحص الكيميائي النباتي وجود الصابونين، التانينات، الفلافونيدات، العفص والكومارينات في حين عدم وجود القلويدات في كلتا النباتين.

التقييم الكمي للمكونات الفينولية بواسطة طريقة الفولين أظهر أن متعدد الفينول في المستخلص الميثانولي لـ *Lavandula stoecha* 95مغ مع معادل حمض الغاليك / غ مستخلص هي أكثر من كميته في مستخلص *Globularia alypum* 84مغ مع معادل حمض الغاليك / غ مستخلص.

إن كمية الفلافونيدات بطريقة ثلاثي كلوريد الألمنيوم قد كشفت عن وجود 30,85 مغ مع معادل الكرسيتين/غ مستخلص بالنسبة لـ *Globularia alypum*، ضد 20,4مغ مع معادل الكرسيتين/غ مستخلص بالنسبة لـ *Lavandula stoechas*.

أظهر التحليل الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة وجود أقسام و مكونات مختلفة من الفلافونيدات في كلتا النباتين، المستخلصين أظهر أيضا وجود قدرة مضادة جذرية لتثبيط الجذر الحر DPPH مع $IC_{50}=0,42$ مغ/مل بالنسبة لمستخلص *Globularia alypum* و 0,45مغ/مل بالنسبة لمستخلص *Lavandula Stoechas*.

إن القدرة المضادة للنشاط البكتيري قد عينت بطريقة الانتشار على جيلوز ميلر هانتن, لأربع أنواع من البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

أوضحت النتائج بأن المستخلص الميثانولي لكل من *Lavandula stoachas* و *Globularia alypum* لم يظهر أي نتائج ضد الأنواع الأربعة من البكتيريا.

الكلمات المفتاح النباتات الطبية, المستخلص الميثانولي , نشاط مضاد الأكسدة, DPPH, النشاط المضاد للبكتيريا.

Figure N°	Les Titres des Figures	N° page
Figure 01	<i>Globularia alypum.</i>	10
Figure 02	<i>Lavandula stoechas.</i>	13
Figure 03	les systèmes de défense contre les radicaux libres.	16
Figure 04	le rot à vapeur.	26
Figure 05	Lyophilisateur.	26
Figure 06	Protocole expérimentale.	27
Figure 07	Droite d'étalonnage de l'acide gallique.	29
Figure 08	Droite d'étalonnage de la quercétine.	30
Figure 09	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	31
Figure 10	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	32
Figure 11	Application des disques d'extraits sur boîtes.	36
Figure 12	Test des Alcaloïdes	37
Figure 13	Test des saponosides.	37
Figure 14	Test des tanins.	38
Figure 15	Test des flavonoïdes.	38
Figure 16	Test des mucilages.	38
Figure 17	Test des coumarines.	39
Figure 18	Le rendement de deux extraits.	40
Figure 19	Teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'EMGA et l'EMLS.	41
Figure 20	Chromatographie sur couche mince des deux extraits méthanoliques Système de solvant : BAW (4-1-5)	44
Figure 21	Chromatographie sur couche mince des deux extraits méthanoliques Système de solvant : chloroforme /méthanol /eau.	46
Figure 22	Chromatographie sur couche mince des deux extraits méthanoliques Systeme de solvant: Acétone /eau.	47

Figure 23	Effet antiradicalaire de l'EMGA et l'EMLS sur le radical DPPH.	49
Figure 24	Valeurs des IC50 en (mg/ml) pour l'EMGA et l'EMLS et l'AA.	50
Figure 25	Test du méthanol sur les 4 souches de références.	51
Figure 26	Aspect macroscopique de la réponse bactérienne aux différents antibiotiques testés.	52
Figure 27	Présentation graphique de l'antibiogramme.	53
Figure 28	Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce <i>S. aureus</i> ATCC 25923 aux extraits testés.	55
Figure 29	Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	55
Figure 30	Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce <i>d'E.coli</i> ATCC 25922.	56
Figure 31	Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce <i>d'E.coli</i> ATCC 25922.	57
Figure 32	Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 aux extraits testés.	58
Figure 33	Figure 33 : Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.	58
Figure 34	Figure 34 : Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce <i>Salmonella spp</i> aux extraits testés.	59
Figure 35	Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce <i>Salmonella spp</i> .	60

Tableau N°	Les Titres des Tableaux	N° page
Tableau 1	La demi-Vie du radical superoxyde et du peroxyde d'hydrogène varie en fonction de l'activité enzymatique des enzymes assurant leur métabolisme.	17
Tableau 2	Les diamètres critiques des antibiotiques utilisés	35
Tableau 3	Screening phytochimique de deux plantes.	37
Tableau 4	Rendement de l'extraction	40
Tableau 5	Teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'EMGA et l'EMLS.	41
Tableau 6	Classes des composées phénoliques identifiées dans les extraits méthanoliques, Système de solvant : BAW (4-1-5)	43
Tableau 7	Classes des composés phénoliques identifiées dans les extraits méthanoliques, Système de solvant : chloroforme /méthanol /eau	45
Tableau 8	Classes des composés phénoliques identifiées dans les extraits méthanoliques, Système de solvant : Acétone /eau.	46
Tableau 9	Les diamètres d'inhibition des souches testées vis-à-vis des antibiotiques	53
Tableau 10	Les diamètres d'inhibition de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	54
Tableau 11	Les diamètres d'inhibition de la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922	56
Tableau 12	Les diamètres d'inhibition de la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.	57
Tableau 13	Les diamètres d'inhibition de la souche <i>Salmonella</i> SPP.	59

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales (**Nostro et al., 2000**) et en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup cherchent les remèdes normaux sans effets secondaires et bien sûr coût élevé de médecine conventionnelle. (**Schnaubelt, 1998**)

La lutte contre le stress oxydant impliqué dans diverse pathologie (maladie neurodégénérative, le diabète, les maladies inflammatoires) constitue aussi une des plus grandes préoccupations scientifiques à travers le monde, ceci est en vue de trouver des nouvelles remèdes, bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes. Cependant, il y a une préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre le stress oxydant et les infections bactériennes. Il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antioxydants synthétiques et des antibiotiques classiques.

Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les tannins, etc. (**Eddouks, 2007**)

De par sa situation géographique particulière, l'Algérie bénéficie d'une gamme très variée de climats favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. En effet, le territoire Algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, la steppe, le Sahara et autour des points d'eau.

Malgré la nature hétérogène d'une biodiversité immense du territoire algérien, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes.

L'évaluation des propriétés anti-oxydantes, et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile pour l'utilisation plus au moins fréquente dans les traditions locales médicinales et culinaires. Ces plantes représentent une source des composés bioactifs.

Dans cette optique, ce travail s'intéresse à l'évaluation des activités antioxydante et antibactérienne de deux plantes de variété locale *Globularia alypum* « Tasselgha» et *Lavandula stoechas* « El halhal».

Les objectifs de la présente étude sont :

- Le screening phytochimique des métabolites secondaires existant dans les deux plantes.
- L'évaluation de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne de chaque plante.
- L'analyse qualitative des composés phénoliques de chaque extrait par la chromatographie en couche mince CCM.
- L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de chaque plante selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH.
- L'évaluation de l'activité antibactérienne des deux extraits vis-à-vis quatre souche bactérienne (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, et *Pseudomonas aeruginos*).

1. Définition

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes ». Elle désigne la médecine basée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels.

➤ On peut la distinguer en trois types de pratiques :

Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement.

Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est le plus souvent une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique.

Une pratique basée sur les avancées et preuves scientifiques qui recherchent des extraits actifs dans les plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique débouche suivant les cas sur la fabrication de médicaments pharmaceutiques ou de phytomédicaments, et selon la réglementation en vigueur dans le pays, leur circulation est soumise à l'autorisation de mise sur le marché pour les produits finis, et à la réglementation sur les matières premières à usage pharmaceutique (MPUP) pour les préparations magistrales de plantes médicinales, celles-ci étant délivrées exclusivement en officine.

On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique.

Une pratique de prophylaxie déjà utilisée dans l'antiquité. Nous sommes tous phytothérapeutes sans le savoir : c'est notamment le cas dans la cuisine, avec l'usage de la ciboulette, de l'ail, du thym, du gingembre ou simplement du thé vert ... Une alimentation équilibrée et contenant certains éléments actifs étant une phytothérapie prophylactique. (Sebai et Boudali, 2012)

2. L'origine des plantes médicinales

Ce sont toutes plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles. (Sofowora, 2010) Donc, une plante dite « médicinale » est une plante qui a des propriétés thérapeutiques. (Catier et Roux, 2007)

L'utilisation des plantes est très ancienne, et pendant très longtemps elle a représenté pratiquement le seul moyen de soigner, basé sur l'empirisme.

Actuellement grâce aux progrès scientifiques considérables enregistrés depuis la fin du XIX^{ème} siècle (essor de la chimie, technique d'analyse et l'extraction etc.).

La thérapeutique est a beaucoup évolué pour arriver à sa forme actuelle qui utilise certaines plantes comme matières premières. **(Catier et Roux, 2007)**

3. Les aspects préparatoires à l'usage médical

En fonction de l'effet thérapeutique recherché, l'usage traditionnel puis la recherche, ont mis au point des procédés de traitement des plantes qui permettent de ne garder que les molécules intéressantes, pour une utilisation locale, buvable ou injectable. Dans les préparations, la composition d'un remède peut réunir différentes plantes. La tisane, le cataplasme appliqué directement sur la peau, le sirop, les solutions alcoolisées ou aqueuses, les essences et les huiles sont les formes les plus courantes de remèdes. **(Sebai et Boudali, 2012)**

➤ **Les tisanes**

Les tisanes sont obtenues par macération, digestion, infusion ou décoction en utilisant de l'eau.

➤ **L'infusion**

Elle consiste à verser sur la plante de l'eau bouillante, couvrir et laisser refroidir 2 à 15 minutes. Elle convient aux plantes fragiles (fleurs et feuilles).

➤ **La décoction**

Elle consiste à maintenir la drogue avec de l'eau à ébullition pendant une durée de 15 à 30 minutes. Elle convient aux plantes "dures " (écorces, racines, fruits et certaines feuilles). **(Sebai et Boudali, 2012)**

➤ **La macération**

Il s'agit de maintenir la plante en contact avec l'eau (température ambiante) pendant 30 minutes à 4 heures. **(Sebai et Boudali, 2012)**

➤ **La digestion**

On maintient la plante en contact avec l'eau (température inférieure à celle de l'ébullition, mais supérieure à la température ambiante) pendant 1 à 5heures. **(Sebai et Boudali, 2012)**

3.1. Les Poudres

Préparées par pulvérisation suivie d'un tamisage, elles entrent directement dans la composition des gélules mais servent aussi à la fabrication d'autres formes galéniques comme les extraits et les teintures. **(Sebai et Boudali, 2012)**

3.2. Les Extraits

Les extraits sont obtenus en traitant la plante dans une solution vaporisable (éther, alcool,...) par divers procédés d'extraction (macération, digestion, infusion, lixiviation) puis en évaporant ces solutions jusqu'à obtenir une consistance fluide, molle ou sèche. On les classe donc selon leurs consistances. **(Sebai et Boudali, 2012)**

3.3. Teintures

Elles sont obtenues à partir de poudres végétales sèches et leur titre alcoolique varie selon le type de drogue. Il peut être à 60° (principes actifs très solubles), à 70° ou 90° à 80° (ex. Produits résineux et huiles volatiles). **(Sebai et Boudali, 2012)**

3.4. Alcoolatures

Ce sont des teintures préparées avec des plantes fraîches n'ayant donc pas subi les effets de la dessiccation. **(Sebai et Boudali, 2012)**

3.5. Alcoolats

Ils sont obtenus par distillation des principes volatils de substances végétales au contact de l'alcool. Ils sont toujours incolores et inaltérables mais il faut les conserver dans des flacons bien bouchés. **(Sebai et Boudali, 2012)**

3.6. Huiles essentielles (HE)

Elles se présentent sous deux formes :

- les HE solides, aussi appelées «camphres d'essence».
- les HE liquides naturelles ou après dissolution (ex.: HE de rose).

Les HE officinales s'obtiennent par entraînement à la vapeur d'eau ou par expression ou par incision.

On les classe selon leur couleur (bleu, jaune, vert brun ou incolore) ou leur composition chimique (HE hydrocarburées, sulfurées et oxygénées pour les solides). **(Sebai et Boudali, 2012)**

3.7. Hydrolats

On obtient les hydrolats par distillation (avec l'eau) de poudre de plantes ou des parties de ces plantes (fleurs, sommités fleuries). Les hydrolats, sont très odoriférants parce que les HE se trouvent en suspension dans l'eau. **(Sebai et Boudali, 2012)**

4. Les éléments actifs des plantes médicinales

Le ou les principes actifs d'une plante médicinale sont les composants naturellement présents dans cette plante ; ils lui confèrent son activité thérapeutique. Ces composants sont souvent en quantité extrêmement faible dans la plante : ils représentent

Quelques pour-cent à peine du poids total de celle-ci, mais ce sont eux qui en sont l'élément essentiel. Des principes actifs se trouvent dans toutes les parties de la plante, mais de manière inégale. Et tous les principes actifs d'une même plante n'ont pas les mêmes propriétés. **(Sebai et Boudali, 2012)**

4.1. Saponines (ou saponosides)

On entend par saponosides (savon -saponaire, l'herbe à savon ; le réglisse ; le bouillon blanc ; le Modène), des hétérosides naturels dont la matière est un composé soluble à l'eau qui la rend moussante comme une eau de savon. **(Sebai et Boudali, 2012)**

4.2. Flavonoïdes

Ils entrent dans la composition de nombreux pigments végétaux et en particulier les pigments jaunes et orange et aussi dans les pigments bleus). Les plantes qui contiennent des flavonoïdes sont souvent liées à la fonction antispasmodique. **(Sebai et Boudali, 2012)**

4.3. Anthocyanes (ou anthocyaniques)

A forte dose, les anthocyanes sont des poisons apparentés au cyanure. Ce sont des dérivés de l'acide cyanhydrique (produit de la combinaison de l'hydrogène avec le cyanogène). On les trouve dans les fleurs bleues (bleuet, violette, mauve). **(Sebai et Boudali, 2012)**

4.4. Mucilages

Ils sont encore des hétérosides. Ce sont des grosses molécules liées à des gommés qui sont d'énormes concrétions de sucres. Ils vont déposer spontanément sur les tissus et vont agir comme protecteur. **(Sebai et Boudali, 2012)**

4.5. Les Vitamines

Substances aminées nécessaires, en faible quantité, au maintien de la vie. Les vitamines sont des substances qui agissent à faibles doses. On distingue les vitamines hydrosolubles et liposolubles. Les plantes fournissent quasiment toutes les vitamines. Certaines plantes en sont riches (ex: Citron--> vitamine C ; Cresson--> vitamines B1, B2, C, E. **(Sebai et Boudali, 2012)**

4.6. Tanins

Le tanin c'est un phénol qui est associé à un sucre. Un des tanins de base est l'acide gallique. Ils précipitent (agglutiner, coaguler) les protéines et la gélatine ce qui est beaucoup plus rare.

On peut en outre les utiliser en cas d'empoisonnement par des alcaloïdes, car il les précipite et les rend inoffensifs (sauf pour la morphine, la cocaïne et la nicotine, pas interaction). Mais si on force la dose, l'excès de tanin libère à nouveau la substance toxique et cause une deuxième inflammation. **(Sebai et Boudali, 2012)**

4.7. Alcaloïdes

Ce sont des substances toxiques et parfois à faibles doses et qui ont des effets thérapeutiques connues. C'est une substance organique azotée d'origine végétale, à caractère alcalin, de structure complexe. On trouve des alcaloïdes dans plusieurs familles de plantes et on en connaît plus de mille. (La morphine, la strychnine, la caféine, la quinine, la colchicine, le curare, l'atropine.) **(Sebai et Boudali, 2012)**

5. Domaines d'application des plantes médicinales

Les substances naturelles issues de végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans : l'industrie, En alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de

médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes de nouvelles molécules actives, ou des matières premières pour la semi-synthèse. **(Bahorun, 1997)**

5.1. En médecine

En tant que médicament pour l'homme :

- En urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, comme laxatifs, sommeil et désordre nerveux. **(Svoboda et Hampson, 1999)**
- Système cardiovasculaire, exemple : Flavoce est un médicament constitué par la flavone en combinaison avec la rutine et l'isoquercétine, il constitue un traitement efficace contre l'athérosclérose. **(Narayana, 2000)**
- Contre le diabète, exemple : *Allium sativum*, *Azadirachta indica*. **(Dastidar, 2004)**
- Les maladies de stress : Les plantes ont des activités antioxydantes, exemple : Le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composés phénoliques. **(Narayana, 2000)**
- Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire : Depuis longtemps, les produits naturels de plantes ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques exemple : La quinine obtenue à partir du quinquina "*Cinchona pubescens*" a été employée avec succès pour traiter la malaria. **(Dastidar, 2004)**

5.2. En agriculture

Les plantes médicinales jouent aussi un rôle très important dans l'agriculture mondiale, ainsi que l'agriculture biologique là où on procède à une utilisation bio-seine en utilisant ces dernières sans recourir à l'emploi de pesticides. Les huiles des plantes médicinales peuvent aussi avoir un contrôle sur divers insectes et nématodes (vers parasites). **(Amjad Hossain, 2005)**

5.3. En alimentation

Certaines plantes médicinales contiennent certaines substances végétales dans des concentrations relativement élevées et contrôlées, c'est-à-dire standardisées. Ainsi, telle ou telle plante est connue pour sa forte teneur en vitamines, en phytohormone,

en sel minéraux, en enzymes... Ces substances sont extraites et/ou conditionnées afin de pouvoir être utilisées par le phytothérapeute aux soins du patient. **(Bahorun, 1997)**

5.4. En cosmétique

A cause des dernières soupçons et ombrages qui tournent autour de la suspicion des produits chimiques et leurs dangers sur le corps humain, la tendance de l'utilisation des plantes médicinales dans les produits de beauté, parfums et articles de toilette ainsi que les produits d'hygiène s'est accélérée. N'empêche que cette tendance existe depuis longtemps, les produits cosmétiques ont utilisé les vertus associées aux plantes. Aujourd'hui, des plantes de plus en plus nombreuses entrent dans la composition de produits destinés à améliorer l'apparence physique. **(Porter, 2001)**

1. *Globularia alypum*

1.1. Habitat et description

Arbuste rameux d'environ 60 cm de hauteur. Feuilles coriaces, glauques, de forme obovale, se terminant en une petite pointe. Fleurs réunies en capitules denses à bractées ciliées, atteignant près de 2 cm de diamètre et disposées le long et au sommet des tiges. Calice velu à cinq dents aigues. Corolle bleue, bilabée, ayant la lèvre supérieure très courte et l'inférieure, à trois dents ; quatre étamines, à anthères d'un bleu violacé, un style, Fruits akéniens. (Boutiti, 2007)

Cette plante originaire de sud de l'Europe sur le pourtour méditerranéen jusqu'en Grèce, Afrique du nord (Algérie, Maroc jusqu'au Sahara) et Asie mineure (Egypte, Arabie) en forêts, dans les terrains rocailloux. (Boutiti, 2007) La période de la floraison se situe en hiver au début du printemps (janvier à mars/avril). Son nom *Globularia* fait référence à la forme globuleuse de l'inflorescence et le terme *alypum* vient du grec alypon qui signifie calmer la douleur. *Globularia alypum* appelée communément Tasselgha (Boutiti, 2007) «Chebra », « Zerga » (Quezel et al., 1963) Au Maroc elle est appelée Ein larneb. (Jouad et al., 2002)



Figure 01 : *Globularia alypum* [Prise Personnelle].

1.2. Identité botanique

Règne : *Plantae*.

Sous-règne : *Trachebeonta*.

Division : *Magnoliopsida*.

Classe : *Magnoliopsida*.

Sous classe : *Asteridae*.

Ordre : *Scrophulariales*.

Famille : *Globulariaceae*.

Genre : *Globularia*.

Espèce : *Globularia alypum* L.

1.3. principes actifs majeurs

L'étude de la composition chimique de la plante a été réalisée dans un but de découvrir. Les principaux produits naturels responsables de ces différentes activités thérapeutiques.

Plusieurs métabolites secondaires ont été mis en évidence :

- **Des acides phénols:** acide p-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide syringique, acide caféique, acide 3-résorcylique, acide sinapique, acide p-coumarique et acide férulique. (Ben Hassine et al., 1982)
- **Des flavonoïdes:** La 4',7-dihydroxyflavone , l'apigénine-7-glucoside, le quercétol, le lutéoline-7-glucoside, la bayine et le rutoside. (Ben Hassine et al., 1982)
- **Des iridoïdes:** la globularine (Maio et Panizzi, 1966), catalpol (Bernard et al., 1974) , la Globularimine , la globularinine (Chaudhuri et Sticher, 1979) ,la globularicisine, la globularidine (Chaudhuri et Sticher, 1981), le globuloside. (Es-Safi et al., 2006)
- **Un aryle glucoside:** la Syringine, un *lignane diglucos* :liriodendrine. (Chaudhuri et Sticher, 1981)
- **Des anthocyanes:** la cyanidine et la paéonidine. (Ben Hassine et al., 1982)
- **Des phenylethanoïdes.** (Es-Safi et al., 2007)

1.4. usage traditionnel et courant

Les feuilles de *Globularia alypum* pourraient être utilisées comme une source potentielle d'antioxydants naturels. (Khlifi et al., 2005; Ben Mansour et al., 2012) Elles sont utilisées aussi dans le traitement des maladies de la peau, et des troubles digestifs, y

compris, l'estomac, douleur intestinales (**Ben Mansour et al., 2012**). Ses feuilles traditionnellement utilisées comme agent hypoglycémiant, laxatif, cholagogue, stomachique, sudorifique et purgative. (**Merghache et al., 2013**) Elle est utilisée en médecine populaire pour le traitement des rhumatismes, la goutte, la typhoïde, la fièvre intermittente et le diabète. (**Ferhi et Aiache, 2010**)

2. *Lavandula stoechas*

2.1. Habitat et description

Lavandula stoechas fait partie de la famille des Lamiacées ou Labiées. Il possède donc les mêmes caractéristiques morphologiques caractéristiques et communes à l'ensemble de cette famille. Le genre *Lavandula* présente les caractères suivants:

- Sous-arbrisseau.
- Inflorescence en épi lâche ou serré.
- Bractées distinctes des feuilles.
- Calice velu-laineux tubuleux, avec 8 à 15 nervures, 5 dents inégales, les 4 inférieures très courtes et la supérieure prolongée par un appendice cordiforme.
- Corolle à tube saillant un peu dilaté à la gorge, à 2 lèvres (la supérieure à 2 lobes, l'inférieure à 3 lobes).
- 4 étamines courtes, deux des quatre étamines appuyés sur la lèvre inférieure de la corolle.
- Anthères uniloculaires

Au départ, les lavandes poussent dans quelques pays du bassin méditerranéen, puis la culture s'est répandue en Europe de l'Est (Bulgarie, Russie, Ukraine...) et même en Tasmanie ou encore au Canada où des plantes mutées peuvent maintenant résister au gel.

Les lavandes affectionnent les sols légers et bien drainés (elles redoutent les excès d'eau). Toutes supportent bien les terrains calcaires hormis la *Lavandula stoechas* et la *Lavandula viridis* qui, quant à elles, exigent un sol acide. Pour prospérer et bien fleurir les lavandes doivent être plantées en plein soleil. (**Besombes. C, 2008**)



Figure 02 : *Lavandula stoechas* [Prise Personnelle].

2.2. Identité botanique

Embranchement : *spermaphytes*.

Sous embranchement : *angiospermes*.

Classe : *dicotylédones*.

Ordre : *tubiflorales*.

Famille : *labiées ou lamiacée*.

Genre : *Lavandula*.

Espèce : *Lavandula stoechas*.

Noms communs : lavande stéchade, lavande papillon, lavande à toupet ou lavande des îles d'Hyères, son nom vernaculaire en arabe est ‘El halhal‘ الحلحال.

2.3. principes actifs majeurs

Selon (Ferrerres et *al.*, 1986) ; Lawrence, 1996) ; (Mastelic et Kustrak, 1997) les constituants chimiques potentiellement actifs du *Lavandula* sont :

- Monoterpenes : α -pinene, β -pinene, β -ocimene, camphre, limonene, p-cymene, sabinene, terpinene.

- Monoterpene alcools : α -terpinol, borneol, lavandulol, linalol, p-cymene-8-ol transpivocarveol.
- Monoterpene aldéhydes : aldéhide de cumine.
- Monoterpene ethers : 1,8- cineole.
- Monoterpene esters : acetate de linalyl , acetate de terpenyl.
- Monoterpene cetonas : carvone, coumarine, cryptone, fenchone, methylheptenone, n-actanone, nopinone, p-methylacetophenone.
- Benzenoides : eugenol, coumarine, carvacrol, acide hydroxycinnamique, acide rosmarinique, thymol.
- Sesquiterpenes : caryophyllene, oxide de caryophyllene, α -photosantanol, α - santalal, α -norantalenone.
- Flavonoïdes.

Lanvandula stoechas renferme comme composés phytochimiques : alpha pinéne, béta pinene, béta santalene, borneol, camphre, caryophyllene, coumarine, geraniol, limonene, linalol, luteoline, 1,8-cineole, acide rosmarinique, tannin.

2.4. Usages traditionnels et courants

Venue de l'ouest du bassin méditerranéen, la lavande était déjà utilisée par les Romains pour conserver le linge et parfumer les bains. Elle est utilisée par décoction des feuilles et des boutons floraux, dans le cas de rhumatisme ou des troubles digestives. (El-Hilaly. J et al., 2003)

1. L'activité antioxydante

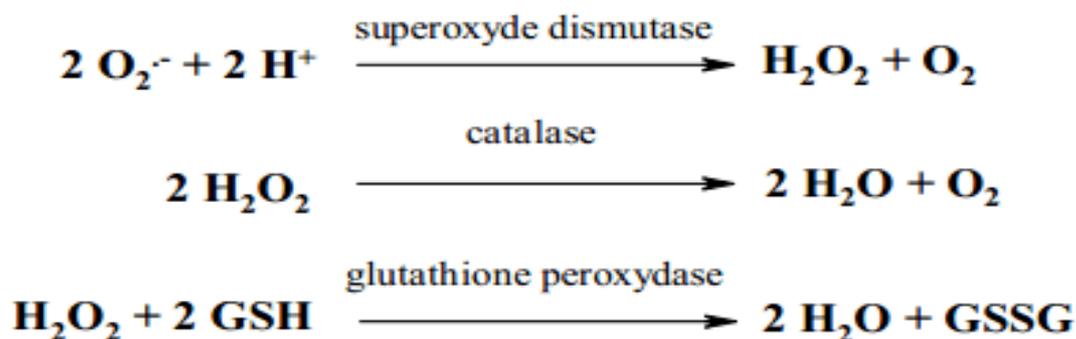
1.1. Définition des antioxydants

Les antioxydants sont des composés très divers qui regroupent des protéines à activité enzymatique (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) et non enzymatique (séquestrant des métaux) et des petites molécules liposolubles (vitamine E, β -carotène) ou hydrosolubles (vitamine C, acide urique) se sont Toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat .(Halliwell, 1999)

L'organisme est capable, dans certaines mesures, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense développés au cours de l'évolution. (Hennebelle, 2006)

1.2. Les antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate). (Favier, 2006) Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



1.3. Les antioxydants secondaires

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (Figure 03). (Dacosta, 2003)

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques,...etc. (Kohen et Nyska, 2002)

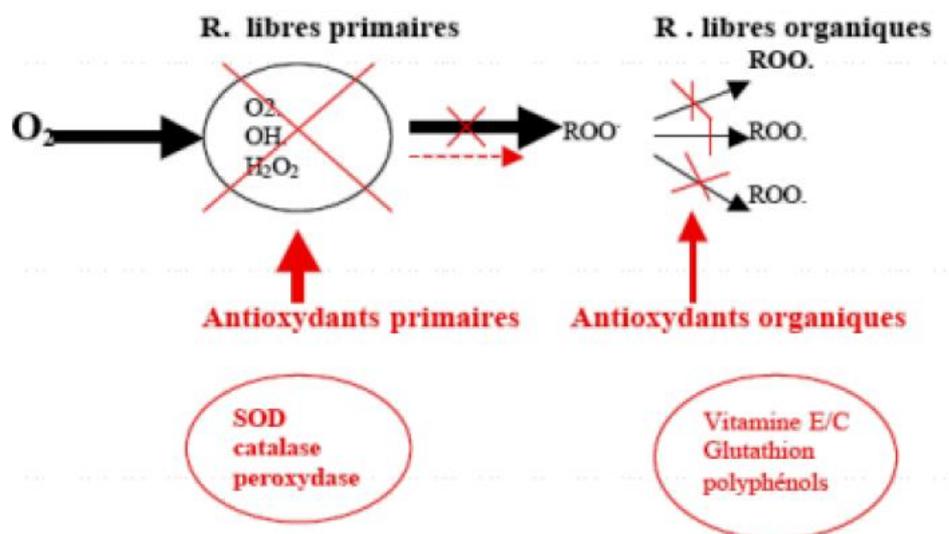


Figure 03 : les systèmes de défense contre les radicaux libres. (Kohen et Nyska, 2002)

1.4. Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique. (Dacosta, 2003)

1.5. Principaux radicaux libres

- l'anion super oxyde : la molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion super oxyde O^{\bullet} . Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions.
- le radical hydroxyle : OH^{\bullet} il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.
- le radical peroxyde : ROO^{\bullet}
- l'oxygène singulet : O^{\bullet} forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité

Tableau 01 : La demi-Vie du radical superoxyde et du peroxyde d'hydrogène varie en fonction de l'activité enzymatique des enzymes assurant leur métabolisme. (Pyror, 1986)

Symbole	Nom	Concentration	Demi-Vie (37°C)
$\bullet\text{O}_2^-$	Radical superoxyde	10^{-12} à 10^{-11} M	Enzymatique *
$\bullet\text{OH}$	Radical hydroxyle	/	10^{-9} s
$\text{NO}\bullet$	Monoxyde d'azote	/	1 à 10 s
$\bullet\text{H}_2\text{O}_2$	Peroxyde d'hydrogène	10^{-12} à 10^{-7} M	Enzymatique *
$\bullet\text{ONOO}^-$	Peroxynitrite	10^{-9} à 10^{-7} M	0,05 à 1 s

1.6 . Les sources de production des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes qu'exogènes. Sans vouloir faire du finalisme, nous pouvons considérer que certaines de ces productions sont volontairement programmées par l'organisme à des fins de défense ou d'envoi des signaux.

- La mitochondrie est la source de production majeure d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ dans la cellule intacte.
- L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par le complexe enzymatique NADPH oxydase des cellules phagocytaires activées.
- Une autre source importante des radicaux sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones.
- Les métaux toxiques (chrome, vanadium, cuivre) mais aussi le fer libres (existant lors de surcharges générales ou localisées)
- Les rayonnements sont par différents mécanismes des sources de radicaux, qu'il s'agisse des rayons ionisants X ou gamma, ou des rayons ultraviolets. (**Durackova, 2008**)

1.7. Stress oxydant

Le stress oxydant est le déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs. (Boyde et al 2003) il correspondant a une perturbation oxydatife du statut.

1.7.1. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. (Favier, 2003).

1.7.2. Implications pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. (Favier, 2003) Il peut être associé à l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, la cataractogénèse, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers. (Cohen et al., 2000; Packer et Weber, 2001) Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux. (Favier, 2003)

2. activité anti microbienne

2.1. Les agents anti microbiens

On désigne par agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique empêchant la croissance et/ou la survie des micro-organismes. (Asada et al., 1998) Ces substances ayant une attirance pour les cellules des parasites et le pouvoir de les tuer plus fort que les dommages qu'elles causent à l'organisme ; ce qui rendra possible la destruction des parasites sans perturbation sérieuse de l'organisme. (Perry et al., 2002)

2.2. Mode d'action des agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et leur spécificité d'action qui peut être germicide ou germistatique.

2.3. Action germicide

Cette action caractérise les agents ayant une action létale sur les microorganismes. En fonction de la catégorie de microorganismes ciblés, les agents antimicrobiens exercent une action bactéricide (agent antibactérien), algicide (agent anti-algues), fongicide (agent antichampignons), virucide (agent anti-virus) ou antiparasitaire (agent anti-protozoaires). **(Bousseboua, 2006)**

2.4. Action germistatique (bactériostatique et fongistatique)

Dans ce cas, les agents inhibent la croissance du microorganisme sans le tuer (bactérie ou Champignon). **(Bousseboua, 2006)** Les substances bactériostatiques inhibent temporairement le développement microbien, les microorganismes recommenceront à se développer dès que la concentration de la substance aura diminué ou dès que l'application du procédé physique sera interrompue. **(Guiraud, 1998)**

2.5. Types d'agents antimicrobiens

Il existe trois types d'agents antimicrobiens : physiques, chimiques et chimio thérapeutiques.

2.5.1. Agents physiques

De nombreux agents physiques exercent un effet antagoniste vis-à-vis des microorganismes. La chaleur ou certains types de radiations ont une action létale qui permet leur emploi dans la stérilisation de différents milieux. D'autres agents moins agressifs, comme la dessiccation limitée sont utilisés à d'autres fins. Les principaux agents physiques sont la chaleur (humide ou sèche), les radiations (micro-ondes, rayons ultra-violet, rayons gamma, rayons bêta, rayons alpha ; rayons X). Chaque type de radiation a une longueur d'onde spécifique qui détermine son énergie, son mécanisme d'action et son domaine d'application. **(Bousseboua, 2006)**

2.5.2. Agents chimiques

Ils correspondent aux substances utilisées comme désinfectants et antiseptiques. Les Désinfectants sont des agents antimicrobiens utilisés sur les matériaux inertes ; leur action est létale ou inhibitrice de la croissance microbienne. Les antiseptiques ont la même nature chimique que les désinfectants mais leur toxicité plus réduite permet leur emploi sur les tissus vivants. Les désinfectants et antiseptiques les plus largement employés sont les alcools, les composés phénoliques qui agissent par dénaturation des protéines et altération des membranes cellulaires, les aldéhydes, les halogènes et les détergents. **(Bousseboua, 2006)**

L'aldéhyde le plus commun est le formaldéhyde, souvent commercialisé en solution à 40% (Formol). Les halogènes sont des composés dérivés du chlore, du brome et de l'iode : hypochlorites et chloramines, hypobromites, iodures, qui ont une action bactéricide par l'oxydation dénaturante des protéines et d'autres composés cellulaires. Les détergents enfin, ont la propriété de solubiliser les résidus normalement peu solubles. Seuls les détergents cationiques sont des désinfectants efficaces. **(Guiraud, 1998)**

2.5.3. Agents chimio thérapeutiques

Un agent chimio thérapeutique est un composé chimique ou de synthèse qui inhibe le Développement des microorganismes. Ce composé agit à faibles doses, il exerce une action très spécifique sur le fonctionnement cellulaire tout en ayant une toxicité sélective.

Il inhibe le développement de sa cible ou la tue tout en étant inoffensif pour l'hôte. Dans ce groupe, on retrouve les antibiotiques, les antifongiques et les antiviraux. **(Guillaume, 2000)**

Il existe actuellement deux grandes catégories d'agents chimio thérapeutiques antibactériens: les sulfamides et les antibiotiques ; ils ont des modes d'action comparables et se distinguent principalement par leur origine. Les sulfamides sont des produits de synthèse alors que la majorité des antibiotiques sont d'origine naturelle (les plus anciens) d'autres de synthèse ou d'hémi synthèse. Les agents chimio thérapeutiques comprennent cinq groupes selon qu'ils affectent la synthèse de la paroi, les échanges cellulaires, la réplication et la transcription de l'ADN, la synthèse des protéines ou certaines réactions du métabolisme intermédiaire. **(Prescott et al., 1995)**

2.6. Détermination de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est déterminée par plusieurs tests : le germe-test, mesure des doses actives ; porte-germes ; doses minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB).

2.6.1. Notion de germe test

On utilise des microorganismes pathogènes "modèles" comme témoins d'efficacité d'un traitement : *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium botilium*, parfois *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et parfois même des virus (virus de la potilynom) pour le traitement de l'eau, *Salmonella typhi* pour les désinfectants, *Staphylococcus aureus* pour les antiseptiques lors de la mesure du coefficient phénol, *Clostridium sporogenes* et *Bacillus Stearothermophilus* pour la chaleur. (Guiraud, 1998)

2.6.2. Détermination des doses actives d'un agent antimicrobien

Il s'agit de comparer l'action d'un antiseptique avec celle du phénol en présence d'un germe test selon un protocole bien précis. Le coefficient phénol est égal au rapport entre la dilution du désinfectant et celle du phénol. (Bousseboua, 2006)

2.6.3. Méthode des porte-germes

Le porte-germes est constitué d'une bandelette de papier filtre. Il est immergé dans une culture d'un germe test, séché puis mis en contact avec le désinfectant pendant des durées croissantes. La survie ou la destruction du germe est mise en évidence par immersion du préalablement séché dans un bouillon nutritif et par essai de culture. (Guiraud, 1998)

2.6.4. Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides

La construction des courbes de croissance in vitro en présence de concentration croissante en agents antimicrobiens permet de définir des concentrations limites : c'est-à-dire la concentration pour laquelle on n'observe pas de croissance visible.

La concentration inhibitrice 50 % ou CMI correspond à une croissance égale à la moitié de la croissance du témoin et la concentration minimale bactéricide (la CMB) correspond à la concentration permettant de tuer tous les micro-organismes. Celle-ci est appréciée par étalement après culture. Ces méthodes sont adaptables aussi bien aux antibiotiques qu'à d'autres substances bactéricides. (Bousseboua, 2006)

1. Récolte du matériel végétal

La partie aérienne (les feuilles, les tiges et les fleurs) a été récoltée au mois de février 2015 au niveau de deux régions.

- La région de Héliopolis de la wilaya de Guelma pour *Globularia Alypum*.
- La région de lekhzara de la wilaya de Guelma pour *Lavandula Stoechas*.

Après une identification botanique par le professeur ZAAFOUR (faculté des sciences, département de biologie – Université Badji Mokhtar Annaba).

Les deux plantes, fraîchement récoltées, ont ensuite été séchées à l'abri de la lumière pendant six semaines puis broyées en poudre. La broyat va constituer la matière sèche qui va servir à la préparation de l'extrait méthanolique.

2. Etude phytochimique

2.1. Tests préliminaires de la composition chimique

2.1.1. Les Alcaloïdes

➤ Macération

Introduire 10g de la poudre végétale dans un erlenmeyer, ajouter 50ml de H₂SO₄ à 10%. Après agitation, laisser macérer 24 heures à la température du laboratoire. Filtrer sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat. (**Attou A, 2011**)

Réactions de caractérisation

- 1 ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de MAYER (5g de KI et 1,358g de HgCl₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée) s'il apparaît un précipité c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes (Précipité blanc-jaunâtre).
- 1 ml de filtrat+ 5 gouttes de réactif de WAGNER (2g de KI et 1,27g d'I₂ solubilisé dans 100 ml d'eau distillée) s'il apparait un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes. (**Attou A, 2011**)

➤ Test de confirmation

Dans un ballon contenant 5g de poudre végétale on verse 25 ml d'acide chlorhydrique 0,05N. Le mélange est laissé en macération sous agitation magnétique à la température ambiante du laboratoire (environ 25°C) pendant 24 heures; puis filtré et lavé à l'eau distillée. La solution obtenue est ensuite ajustée à 20ml avec de l'eau distillée, et après réaliser les tests de caractérisation précédents. (Attou A, 2011)

2.1.2. Coumarines

1g d'échantillon de la poudre végétale est placé dans un tube à essai en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Le tube est recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et porté dans un bain marie pendant quelques minutes. Puis ajouter 0,5ml de NH₄OH dilué (10%) mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines. (Rizk, 1982)

2.1.3. Tanins

➤ Extraction

Dans un Erlenmeyer, disperser 5g de poudre dans 100 ml d'eau bouillante. Après infusion pendant 15 mn, filtrer et compléter le filtrat à 100 ml avec l'eau distillée.

➤ Mise en évidence des tanins

➤ Caractérisation par le chlorure ferrique

A 5ml de filtrat, ajouter quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique (FeCl₃) à 2%, puis agiter le mélange. Le test positif est révélé par l'apparition d'une couleur brun-vert. (Karumi et al., 2004)

➤ Différenciation des tanins

➤ Tanins catéchiqes

A 5ml de solution, on ajoute 5ml d'HCl concentré. L'ensemble est porté à ébullition pendant 15mn puis on filtre sur papier filtre. En présence de tanins catéchiqes, il se forme un précipité rouge.

➤ Tanins Galliques (Réaction de Stiasny)

A 30 ml de solution, ajouter 15 ml de réactif de Stiasny (10ml de formol à 40% et 5ml d'HCl concentré), puis chauffer le mélange au bain-marie à 90°C pendant 15 mn

environ. Après filtration, le filtrat a été saturé par 5g d'acétate de sodium. Ajouter 1 ml goutte à goutte d'une solution de FeCl_3 à 1 %. L'obtention d'une teinte bleue noire montre la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

2.1.4. Flavonoïdes

➤ Extraction

Mettre 3g de la poudre végétale séchée avec 75ml d'eau distillée dans une fiole. Le mélange est porté à ébullition pendant 15 mn puis filtrer sur papier filtre et laisser refroidir. (Edeoga1 et al., 2005)

➤ Réaction générale de caractérisation des flavonoïdes

➤ Coloration en milieu alcalin

En milieu alcalin, les flavonoïdes se dissolvent facilement en donnant des colorations allant du jaune au brun.

A 2ml d'extrait, ajouter quelques millilitres de soude au 1/10e dans un tube à essai. (Okmu, 2005) Le test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune orangé.

➤ Coloration par perchlorure de fer (FeCl_3)

Les flavonoïdes, du fait de la présence de fonction phénolique dans leur génines, donnent des colorations variées avec des solutions diluées de FeCl_3 .

A 2ml de la solution extractive ajouter 2 à 3 gouttes d'une solution diluée de FeCl_3 à 2% le test positif est révélé par l'apparition d'une couleur verdâtre. (Okmu, 2005)

2.1.5. Saponosides

Porter à ébullition 100ml d'eau distillée dans un Erlenmeyer de 250ml puis on ajoute 1g de la poudre ensuite maintenir le mélange à ébullition pendant 15 mn. Après filtration, ajuster le filtrat à 100 ml.

Remplir 1ml du décocté à 1% préparé dans un tube à essai et ajuster le volume à 10 ml avec de l'eau distillée. Ensuite, agiter les tubes à essai verticalement, laisser reposer pendant 15 mn. L'apparition d'une mousse qui dure quelque instant indique la présence des saponosides. (Karumi et al., 2004)

2.1.6. Mucilages

Introduire 1ml du décocté à 10% dans un tube à essai et ajouter 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux indique la présence de mucilages. (Karumi et al., 2004)

2.2. Préparation de l'extrait méthanolique

Cette opération consiste à épuiser le matériel végétal par plusieurs solvants organiques. Cette dernière comprend les étapes suivantes :

a) Délipidation

125 g de chaque plante (*Globularia Alypum* et *Lavandula Stoechas*) sont macérés séparément dans l'éther de pétrole. Cette macération est répétée trois fois avec filtration et renouvellement du solvant à chaque fois.

b) Dépigmentation

Le résidu obtenu après la délipidation est macéré trois fois avec le chloroforme en filtrant à chaque fois.

c) Extraction des polyphénols

L'extraction s'effectue par macération dans le méthanol suivie d'une filtration. Cette opération est répétée trois fois.

- Les trois filtras sont récupérés et évaporés à basse température (35°C) dans un rot à vapeur (R-215) (**figure04**). Le résidu est récupéré dans des flacons hermétiquement fermés, puis lyophilisé (**figure 05**). Le lyophilisat est pesé pour calculer le rendement de l'extraction.



Figure 04 : le rot à vapeur

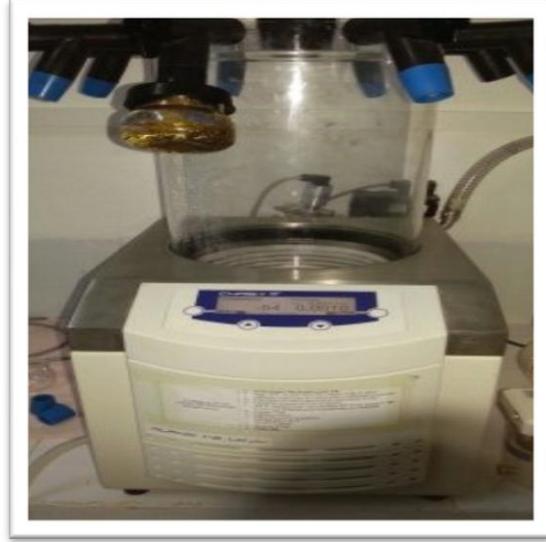


Figure 05 : lyophilisateur

➤ **Calcul du rendement**

Le rendement de l'extraction est le rapport entre le poids de l'extrait obtenu et le poids initial de la plante utilisée. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

Tel que

$$\mathbf{R = 100 \, m / m_0}$$

R : le rendement en %.

m : la masse de l'extrait.

M₀ : la masse initiale de la plante.

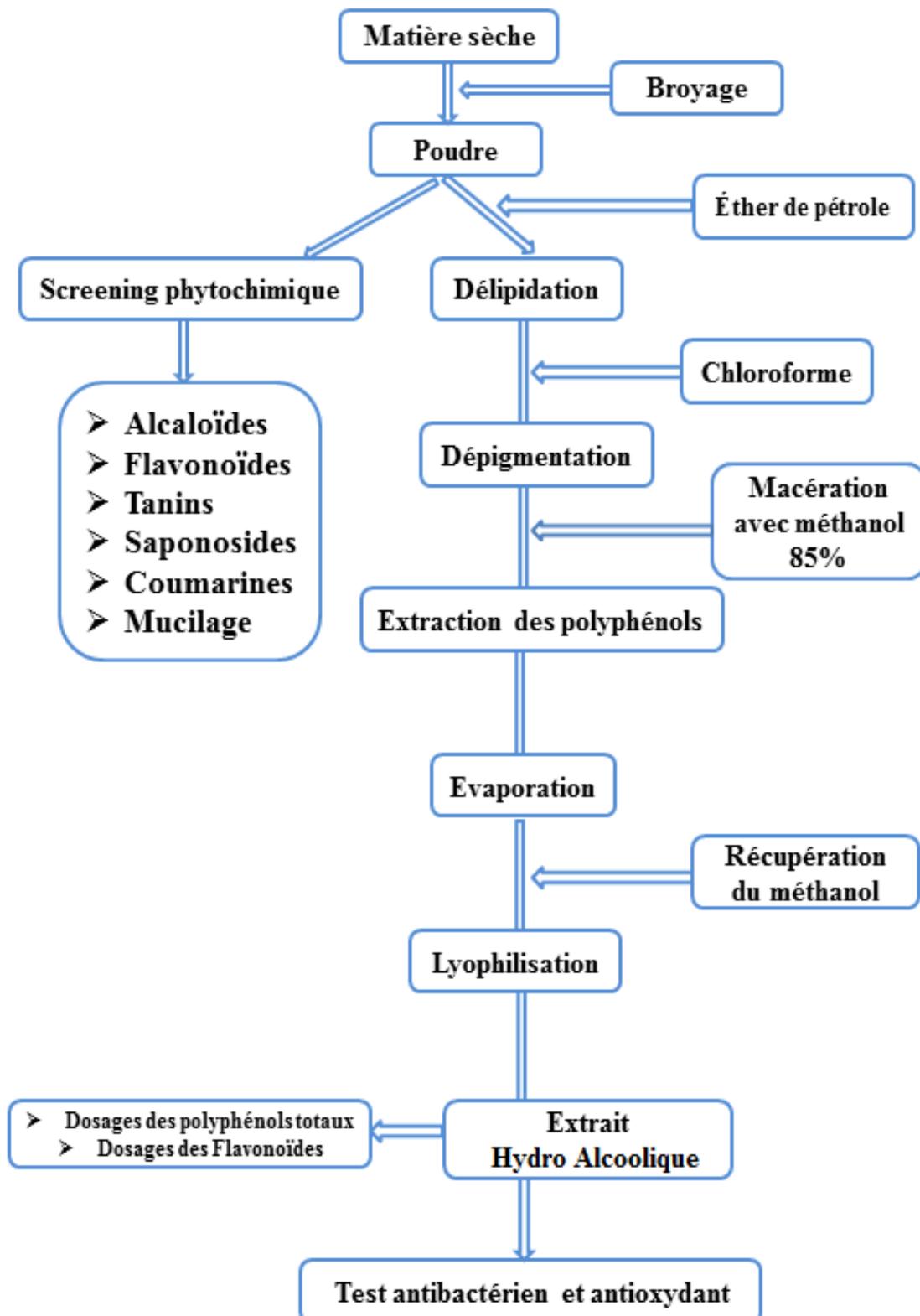


Figure 06 : Protocol expérimentale.

2.3. Analyse des extraits méthanoliques de *Lavandula Stoechas* et de *Globularia Alypum*

2.3.1. Dosage des polyphénols

La teneur en composés phénoliques des deux extraits méthanoliques de *Lavandula Stoechas* et *Globularia Alypum* (EMLS et EMGA) a été effectuée par la méthode de Folin-ciocalteu selon. (Li et al., 2007) Ce dosage est basé sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstic (WO_4^{-2}), phosphomolybdic (MoO_4^{-2}) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés polyphénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. (Georgé et al., 2005)

Brièvement 200 μl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin (dilué 10 fois) avec des dilutions convenables. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes.

Après l'incubation 800 μl d'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (0,75%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (**figure 07**).

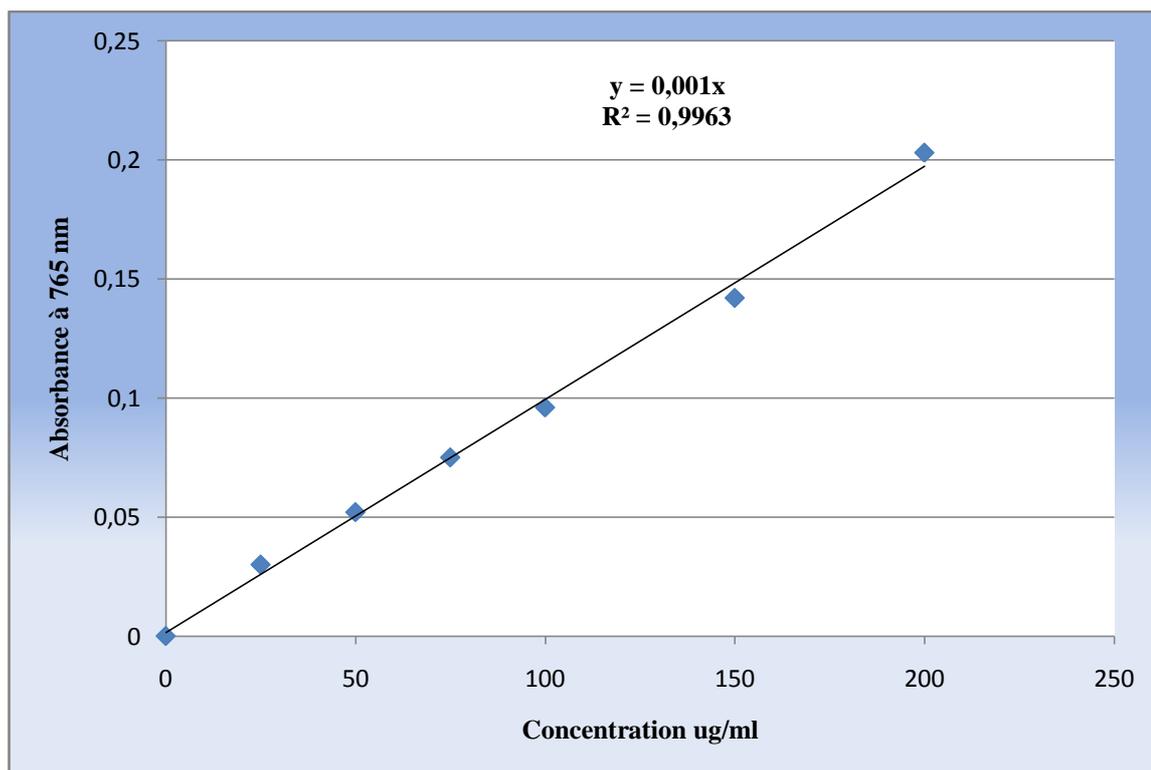


Figure 07: Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

2.3.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium est employée pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux dans nos extraits. (Yi et al., 2007) Brièvement, les échantillons sont préparés par la dissolution de 1mg (extrait)/ml (méthanol). 1 ml de chaque échantillon est ajouté à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2%, dans le méthanol). (Zhishen et al., 1999) Après dix minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une gamme étalon est établie séparément avec la quercétine (0-40 $\mu\text{g/ml}$) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (figure 08).

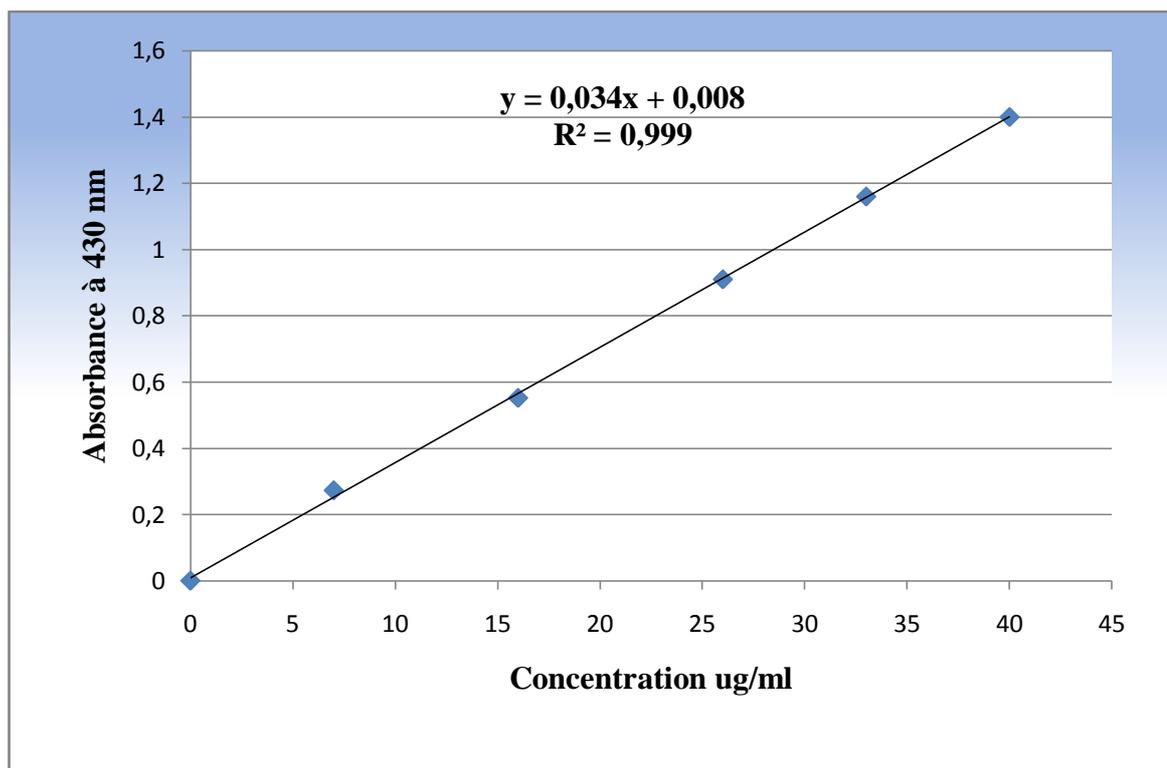


Figure 08 : Droite d'étalonnage de la quercétine.

3. Séparation et identification par chromatographie sur couche mince (C.C.M)

Deux microlitres 2µl de chaque extrait sont déposés à des pointes repères à 1,5 cm du bord inférieure de la plaque. On a employé comme éluant un mélange de BAW (*n*-Bu OH, HOAc, H₂O (4 : 1 : 5), un mélange Acétone/Eau (1 :1) et le système solvants chloroforme /Méthanol /Eau (90 :10 :5).

Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV à 254. Les couleurs des spots ainsi que les valeurs ont été enregistrées RF.

Le RF est donné par la formule suivante :

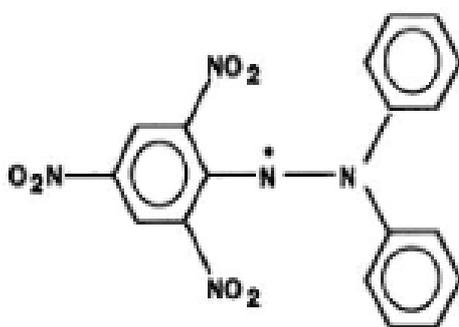
$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par l'échantillon}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

4. L'évaluation de l'activité anti-oxydante : Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

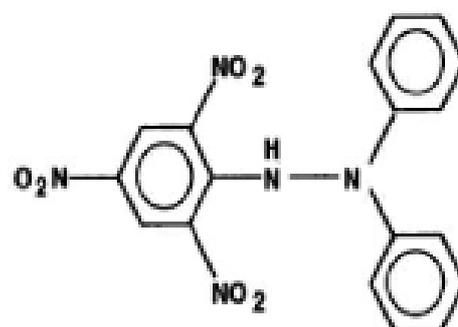
Pour étudier l'activité antiradicalaire des deux extraits, nous avons opté le DPPH comme un radical libre qui est le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité anti-oxydante en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse. (Bozin *et al.*, 2008) Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm. Le test consiste à mettre le radical DPPH (**figure 09**) (de couleur violette), en présence des molécules dites anti-oxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire (**figure10**). La forme réduite (diphénylpicryl-hydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 515 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance. (Sanchez-moreno, 2002)

Selon le protocole décrit par (Mansouri *et al.*, 2005). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4mg de DPPH dans 100ml de méthanol (6×10^{-5} M). 25 μ l des solutions d'extraits ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 975 μ l DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30min et la décoloration par rapport au contrôl négatif contenant la solution de DPPH et du méthanol est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = \frac{(\text{Abs contrôle}) - (\text{Abs échantillon})}{(\text{Abs contrôle})} \times 100$$



A: Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)



B: Diphenylpicrylhydrazine (non radicalaire)

Figure 09 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

L'activité anti-oxydante de l'EMGA et l'EMLS vis-à-vis le radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

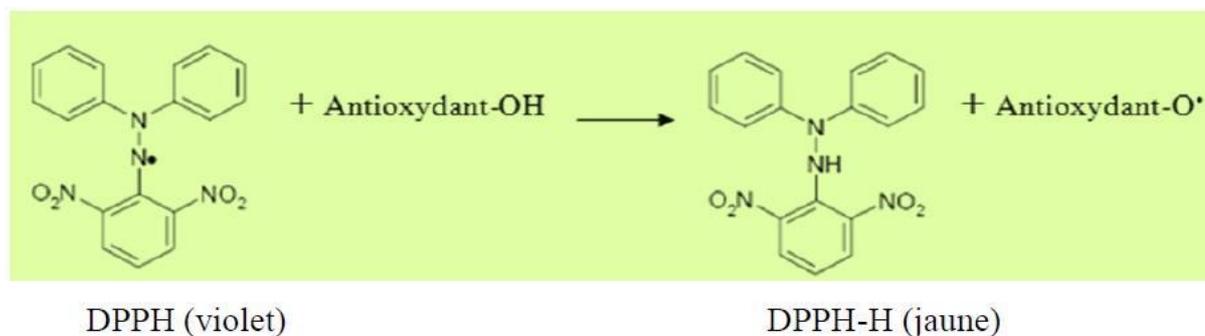


Figure 10 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

➤ Calcul des IC₅₀

IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC₅₀ (Efficient concentration 50%), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées. (Torres, 2006)

- L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

5. Tests microbiologiques

5.1. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans l'essai antibactérien sont: les bactéries à Gram négatif, *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922) et les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Elles proviennent du laboratoire de microbiologie de l'hôpital IBN ZOHR, Guelma et du laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université 08 Mai 1945, Guelma.

Escherichia coli

Bacille à Gram négatif, commensal du tube digestif, c'est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des

diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales. (Nataro et Kaper, 1998)

Pseudomonas aeruginosa

Bacilles à Gram négatif, c'est une bactérie de l'environnement opportuniste souvent à l'origine des infections nosocomiales. Il s'agit aussi de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques. (Philippon, 1995)

Staphylococcus aureus

Les Staphylocoques sont des cocci à Gram positif qui tendent à se grouper en amas. L'espèce *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré), tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales. (Chambers, 1997)

Salmonella spp

Bacille à coloration de Gram négative, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae et au genre Salmonella. Ce genre comporte 2 espèces (*S. enterica* et *S. bongori*); l'espèce *S. enterica* est elle-même divisée en 6 sous-espèces (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *housteanae* et *indica*). (Anon, 1997)

5.2. Milieux de culture utilisés

- **Gélose nutritive (GN)** : un milieu d'isolement non sélectif utilisé dans le but de contrôler la pureté de la souche bactérienne, et le repiquage de cette dernière.
- **La gélose de Mueller Hinton (MH)** : est reconnu par tous les experts comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques et toutes autres substances qui possèdent une activité antibactérienne.

5.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

5.3.1. Préparation des suspensions bactériennes

Les bactéries à tester sont ensemencées par stries sur des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) puis incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune et des colonies bien isolées.

A partir de ces boîtes, et à l'aide d'une anse de platine quelques colonies isolées et identiques sont prélevées et mises dans 5ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est bien homogénéisée puis la densité optique lue à 625 nm est justifiée

de 0.08 à 0.10 nm afin d'obtenir une charge bactérienne de l'ordre de 0,5 Mc Farland, donc l'inoculum est ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop concentré. (Mohammedi, 2006)

5.3.2. Ensemencement

Couler le milieu Mueller-Hinton (MH) dans les boîtes de pétri à une épaisseur de 4 mm à proximité du bec bunsen et laisser la gélose se solidifier.

Tremper un écouvillon stérile dans chaque suspension bactérienne préalablement préparée et l'essorer en le pressant sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.

Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose (les boîtes sont préalablement séchées) de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération en tournant la boîte deux fois de 60°.

5.3.3. Test du méthanol ou contrôle négatif

Après ensemencement du MH par les suspensions bactériennes (0,5 Mc Farland), des disques stériles de papier whatman de 6 mm de diamètre sont déposés en surface à raison de deux disques par boîte, par la suite un volume de 10 µl de méthanol est déposé sur un disque, autre disque qui reste imbibé directement dans le méthanol. Les boîtes sont incubées 24 heures à 37°C. Après incubation, les diamètres d'inhibitions formés sont mesurés. (Lesueur et al., 2007)

5.3.4. Antibiogramme ou contrôle positif

A l'aide d'une pince stérile, des disques d'antibiotique (Chloramphénicol 30µg, Erythromycine 15µg, Amoxicilline + Acide clavulanique 30µg, la Pénicilline 10µg, et Tétracycline 30µg) sont déposés à la surface de la gélose MH ensemencée par les différentes souches sélectionnées, puis les boîtes sont incubées 24 heures à 37°C. De même après incubation, les diamètres d'inhibitions formés sont mesurés. (Hussain et al., 2010) et comparés aux diamètres critiques (tableau 02).

Tableau 02 : Les diamètres critiques des antibiotiques utilisés. (Louis Michel, 2010-2011)

Antibiotiques	Charge des disques	Diamètre critiques	
		Sensibles	Résistantes
Pénicilline (P)	10 µg	≥29	□ 18
Erythromycine (E)	15 µg	≥22	□ 17
Chloramphénicol (C)	30 µg	≥23	□ 19
Tétracycline (TE)	30 µg	≥ 19	< 17
Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC)	30 µg	≥ 21	<16

5.3.5. Méthode de diffusion en milieu gélosé ou aromatoigramme

L'aromatoigramme est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'extrait à tester.

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des extrait sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri, elle nous permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'extrait sur les inocula, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cet extrait. (**Gachkar et al., 2007**)

La technique consiste à :

- déposer à l'aide d'une pince stérile des disques imbibés dans la gamme de concentration d'extrait (2mg, 4mg, 8mg, 10mg, 50mg, 100mg, 150mg, 200mg, 250mg, 300mg, 350mg, 400mg, 450mg)/ml du méthanol à la surface de la géloseensemencée par les souches sur boîte de Pétri (**figure 11**). Puis incubé 18 à 24h à 37°C. Durant cette période, les substances diffusent dans la gélose à partir des

disques selon un gradient de concentration jusqu'à une limite où sa concentration est la plus faible, déterminant ainsi des zones d'inhibition. (Hamidi, 2013)



Figure 11 : Application des disques d'extraits sur boîtes.

L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition et en fonction de ce diamètre la souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante. (Hamidi, 2013)

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre \square 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15à 19mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre $>$ 20mm.

Cette technique est réalisée en triplicata.

1. Résultats de l'étude phytochimique

1.1. Tests préliminaires de la composition chimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur le matériel végétal broyé de *Globularia alypum* et de *Lavandula stoechas*, en utilisant des réactifs spécifiques de révélation. Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux des plantes étudiées. La détection de ces composés chimiques est basée sur des réactions de précipitation, apparition de la mousse, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette, les résultats sont exprimés dans le **tableau 03**.

Tableau 03 : Screening phytochimique de deux plantes.

plantes	Test					
	Alcaloïdes	Saponosides	Tanins	Flavonoïdes	Mucilages	Coumarines
<i>Globularia alypum</i>	-	++	++	++	++	+
<i>Lavandula stoechas</i>	-	++	++	+	++	++

(-): non détectable, (+): faible quantité, (++) : grande quantité

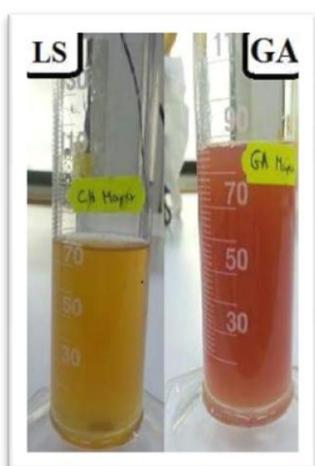


Figure 12 : Test des Alcaloïdes

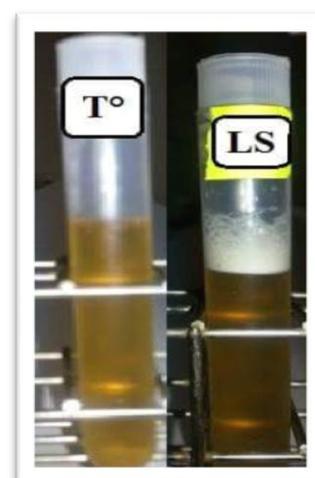


Figure 13 : Test des saponosides

(T⁰ : Tube initial. GA : *Globularia alypum*. LS : *Lavandula stoechas*)

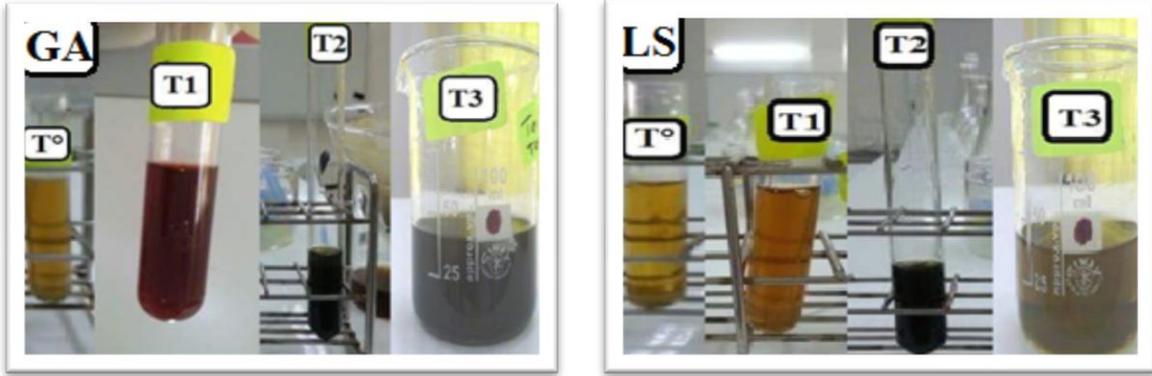


Figure14 : Test des tanins.

GA : Globularia alypum. LS : Lavandula stoechas

(T^0 : Tube initial, $T1$: Caractérisation par le chlorure ferrique, $T2$: Tanins Catéchiqes, $T3$: Tanins Galliques).



Figure 15 : Test des flavonoïdes

GA : Globularia alypum. LS : Lavandula stoechas

(T^0 : Tube initial $T1$: Coloration par perchlorure de fer ($FeCl_3$) $T2$: Coloration en milieu alcalin).



Figure 16 : Test des mucilages.

(T^0 : Tube initial *GA : Globularia alypum. LS : Lavandula stoechas*)

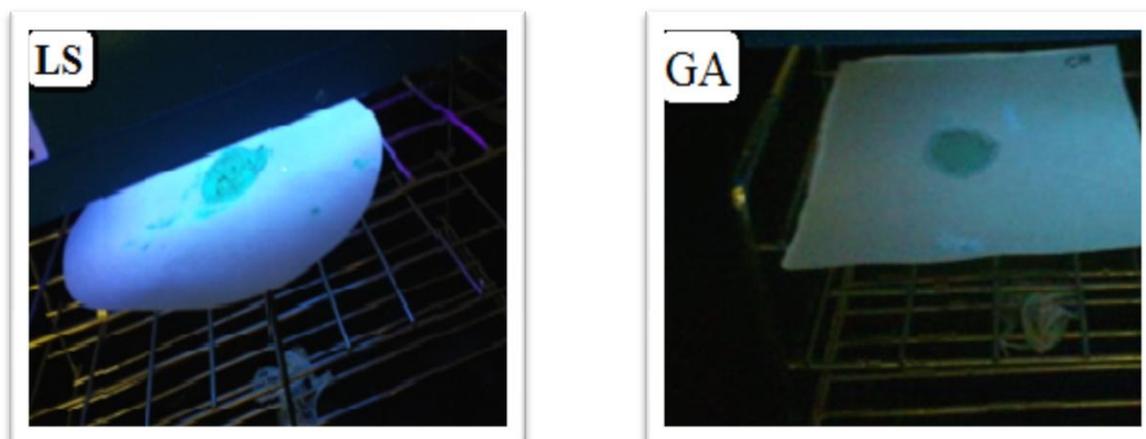


Figure 17 : Test des coumarines.

(GA : *Globularia alypum*. LS : *Lavandula stoechas*)

Notre étude nous a permis en premier lieu d'identifier les principaux groupes chimiques présents dans *Globularia alypum* et *Lavandula stoechas*.

Le screening phytochimique montre la présence des groupes chimiques suivants : les Saponosides, les Tanins, les flavonoïdes, les Mucilages et les coumarines avec l'absence des alcaloïdes dans les deux plantes.

De façon général, les familles chimiques détectées dans notre étude viennent confirmer les travaux de **Boutiti, (2007)**, **Hanene et al., (2010)** et **Daycem et al., (2011)** sur la *Globularia alypum* et les études réalisées par **Balouiri, (2011)** et **Laib, (2012)** sur la famille labiées Genre : *Lavandula stoechas*.

L'étude de la composition chimique des feuilles de *Globularia alypum* et *Lavandula stoechas*, a révélé la richesse de ces deux plantes en métabolites secondaires connus par leurs propriétés thérapeutiques intéressantes. Ils représentent des sources prometteuses pour des nouveaux médicaments d'origine végétale. **Zeghada, (2009)**

1.2. Rendement de l'extraction

Les extraits méthanoliques obtenus présentent généralement un aspect d'une poudre de couleur verte pour *Globularia alypum* et de couleur verte jaunâtre pour *Lavandula stoechas*. La rendement de l'extraction à partir de 125 g du matériel végétal est mentionné dans le **tableau 04**.

Tableau 04 : Rendement de l'extraction

	<i>Globularia alypum</i>	<i>Lavandula stoechas</i>
Rendement (g)	15,2003	5,7502
Rendement %	12,16	4,60

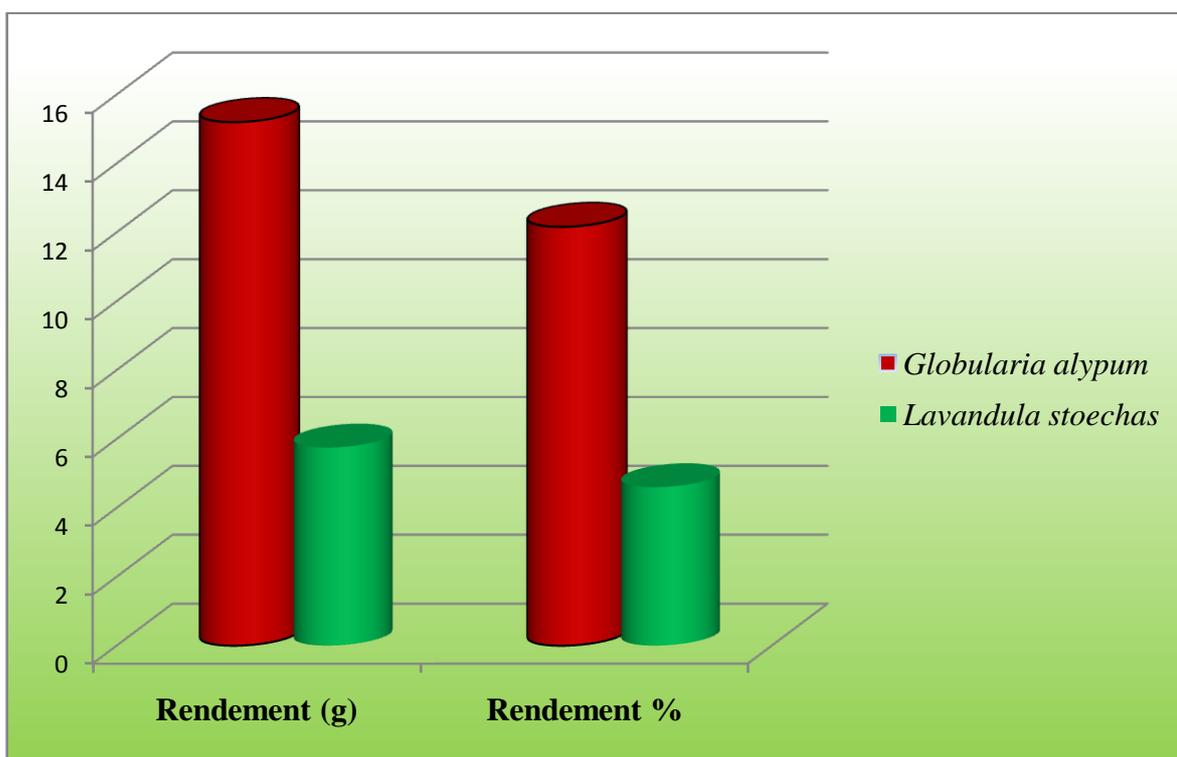


Figure 18 : Le rendement de deux extraits.

Les résultats obtenus montrent que le rendement en extrait méthanolique est variable selon les espèces des deux plantes. Cependant, le rendement le plus important est enregistré dans *Globularia alypum* (12,16%) contre (4,60%) de *Lavandula stoechas*.

Selon une étude menée par **mohhamedi, (2006)** sur la même espèce *Lavandula stoechas*, le rendement en extrait méthanolique de la partie aérienne entière est de 2,398% rendement inférieure à celui obtenu dans notre étude.

Daycem *et al.*, (2011) de son coté a réalisé une étude sur l'extrait méthanolique de *Globularia alypum*, il a trouvé un rendement de 42%, rendement supérieur à celui obtenu dans notre étude 12,16%.

D'une façon générale, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans les quelles l'extraction à été effectuée Lee *et al.*, (2003) Yrjonen, (2004).

1.3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Le résultat de dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes sont exprimés dans le tableau 05.

Tableau 05 : Teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'EMGA et l'EMLS.

	Teneur en polyphénols (mg EAG /g extrait)	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g extrait)
<i>Globularia alypum</i>	84	30,85
<i>Lavandula stoechas</i>	95	20,4

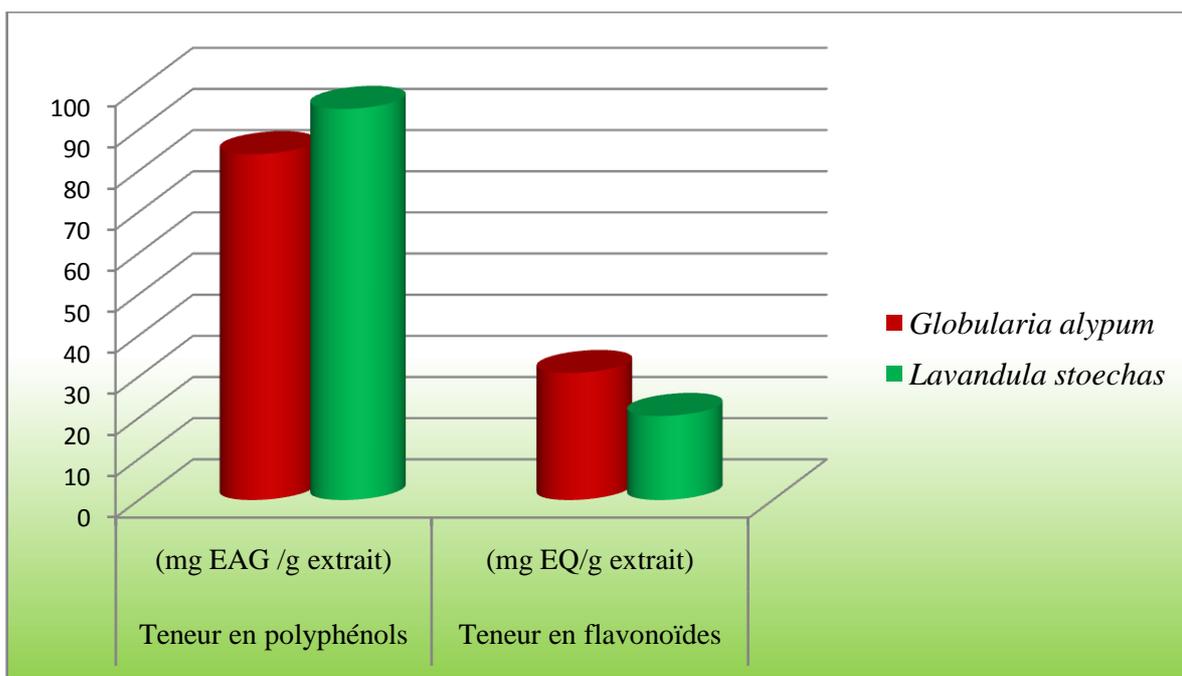


Figure19 : Teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'EMGA et l'EMLS

La méthode modifiée de Folin-ciocalteu s'est avérée efficace pour le dosage des polyphénols totaux dans les deux extraits méthanoliques. Cette méthode a été choisie car elle satisfait aux critères de reproductibilité et de faisabilité. L'évaluation quantitative de ces composés phénoliques montre que la quantité de polyphénols dans l'extrait méthanoïque de *Lavandula stoechas* (95 mg EAG/g extrait) est supérieure à celle de *Globularia alypum* (84 mg EAG/g extrait). Tandis que la méthode de trichlorure d'aluminium montre la forte existence des flavonoïdes chez *Globularia alypum* (30,85 mg EQ/g extrait) avec des quantités appréciables de ce phénol (20,4mg EQ/g extrait) chez *Lavandula stoechas*.

Les résultats obtenus viennent confirmer les travaux de **mohammedi, (2006)** qui a estimé la richesse de *Lavandula stoechas* en polyphénols totaux avec une valeur de 99mg EAG/g extrait). Proche à celle obtenue dans notre résultat. tandis que le contenu en composés phénoliques marqué par **Daycem et al., (2011)** avère un teneur de (116,89 ± 2,8 mg EAG/g extrait) chez la *Globularia Alypum* qu'il est nettement supérieure à celle obtenue dans notre étude. Ces différences peuvent être dues à la variabilité du métabolisme phénolique dans différentes plantes mais aussi à la différence dans les conditions climatiques (température, l'exposition solaire, la sécheresse et la saison de croissance). Ce qui conduit à perdre quelques composés phénoliques.

Il est intéressant de déterminer la quantité de flavonoïdes dans les extraits méthanoliques afin de mieux les caractériser. Le dosage des flavonoïdes mené dans notre épreuve montre que la *globularia alypum* révèle une valeur supérieure à celle obtenue par **chograni et al., (2012)** (8,35 mg EQ/g extrait) et **Daycem et al., (2011)** (19,29 ± 0,04mg EQ/g extrait) et inférieure à celle obtenue par **Zeghada, (2009)** (66,828±6,568 mg EQ/g extrait) sur la même espèce.

1.4. Résultats de la CCM

Trois systèmes de solvant ont été utilisés, les chromatogrammes résultants comportent une série de spots (**figures 20, 21, 22**). L'identification des composés était basée sur la comparaison des Rf et couleurs observées sous lampe UV des taches apparues sur CCM avec des étalons notés dans les mêmes conditions expérimentales. Suit au nombre réduit des étalons disponibles. Pour certains, on s'est arrêté à l'identification de la classe phénolique. Les classes des flavonoïdes varient dans le type et les quantités dues aux variations de la croissance des plantes, des conditions environnementales et de la maturité.

Les **tableaux (06, 07, 08)** Comportent les Rf des différents spots apparus avec les différents systèmes solvants utilisés, ainsi que la couleur révélée sous une lampe UV. Un ensemble de spots a été obtenu par les différents systèmes solvants pour les deux extraits méthanologiques.

Tableau 06 : Classes des composés phénoliques identifiés dans les extraits méthanologiques, Système de solvant : BAW (4-1-5)

Extrait	Couleur sous l'UV	RF	Types de flavonoïdes possibles markham, (1982)
<i>Lavandula stoechas</i>	Jaune	0,32	Flavonols
	Bleu pale	0,37	Acide phenol
	Jaune	0,43	Flavonols
	Mauve	0,49	Anthocyanidines 3-glycosides
	Bleu	0,50	Acide phenol
	Gris	0,50	
	Jaune	0,51	Flavonols
	Jaune	0,53	Flavonols
	Jaune grisâtre	0,56	
	Bleu	0,58	A Acide phenol
	Jaune pale	0,63	Flavonols
	violet	0,60	Flavonols
	Jaune	0,64	Flavonols
	Bleu blanc fluorescent	0,65	Flavonols. Flavones .isoflavones flavonones
	Jaune	0,66	Flavonols
	violet	0,67	Flavones
	Bleu vif	0,71	Acide phenol
	Jaune pale	0,73	Flavonols
	Bleu blanc fluorescent	0,77	Flavonols. Flavones .isoflavones flavonones
	Pourpre sombre	0,79	Flavonols. Flavones chalcones .isoflavones flavonones
Bleu blanc fluorescent	0,80	Flavonols. Flavones .isoflavones flavonones	

Extrait	Couleur sous UV	RF	Types de phénol flavonoïde possible Ben Hassine et <i>al.</i> , (1982)
<i>Globularia alypum</i>	Mauve	0,36	l'apigénine-7-glucoside
	Pourpre sombre	0,38	
	Jaune	0,42	
	Pourpre sombre	0,43	
	Jaune	0,48	
	Jaune	0,51	
	Orange pale	0,53	lutéoline-7-glucoside
	Bleu blanc fluorescent	0,56	La 4',7-dihydroxyflavone
	Bleu blanc fluorescent	0,59	La 4',7-dihydroxyflavone
	Mauve	0,59	l'apigénine-7-glucoside
	Gris	0,63	
	orange	0,66	lutéoline-7-glucoside
	Mauve	0,67	l'apigénine-7-glucoside
	rouge	0,72	lutéoline-7-glucoside
	Gris sombre	0,74	
Bleu sombre	0,79		



Figure 20 : Chromatographie sur couche mince des deux extraits méthanoliques

Système de solvant : BAW (4-1-5)

(GA : *Globularia alypum*. LS : *Lavandula stoechas*)

Tableau 07 : Classes des composés phénoliques identifiés dans les extraits méthanoliques, Système de solvant : chloroforme /méthanol /eau

Extrait	Couleur sous l'UV	RF	Types de phénol flavonoïde possible (markham, 1982)
<i>Lavandula stoechas</i>	Vert	0,04	Flavonones, flavonols, auronse
	Bleu	0,05	Acides phénol
	Gris sombre	0,07	
	Bleu vif	0,08	Acides phénol
	Mauve	0,11	Anthocyanidines 3-glycosidse
	Bleu	0,14	Acides phénol
	Gris	0,21	
	Bleu	0,24	Acides phénol
	Violet	0,39	flavones
	Jaune	0,43	Flavonols
	Mauve	0,77	Anthocyanidines 3-glycosides
	rouge	0,91	Anthocyanidines 3-glycosides

Extrait	Couleur sous l'UV	RF	Types de phenol flavonoïide possible (Ben Hassine et al., 1982)
<i>Globularia alypum</i>	Bleu	0,02	
	Bleu	0,05	
	Violet	0,09	La 4',7-dihydroxyflavone
	Violet	0,11	La 4',7-dihydroxyflavone
	Jaune	0,14	
	Mauve	0,17	l'apigénine-7-glucoside
	Violet	0,22	La 4',7-dihydroxyflavone
	Mauve	0,27	l'apigénine-7-glucoside
	Jaune	0,38	

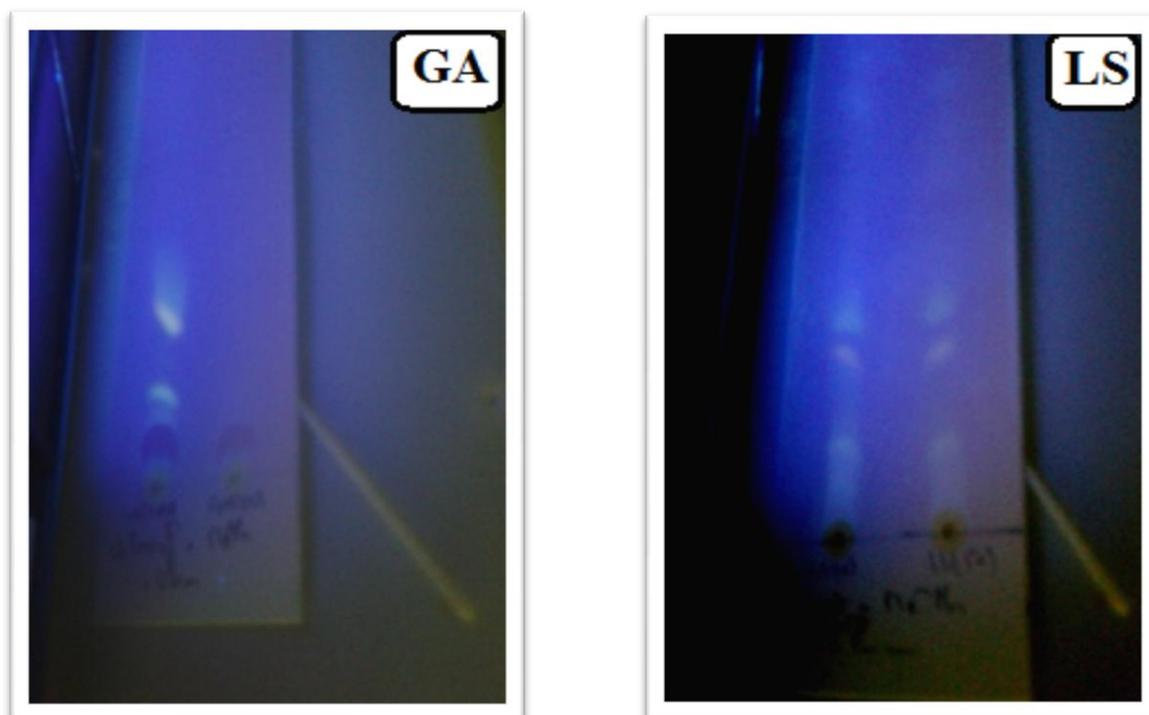


Figure 21 : Chromatographie sur couche mince des deux extraits méthanoliques
 Système de solvant : chloroforme /méthanol /eau
 (GA : *Globularia alypum* LS : *Lavandula stoechas*)

Tableau 08 : Classes des composés phénoliques identifiés dans les extraits méthanoliques, Système de solvant : Acétone /eau.

Extrait	Couleur sous l'UV	RF	Types de phénol flavonoïde possible markham, (1982)
<i>Lavandula stoechas</i>	Rouge	0,24	Anthocyanidines 3-glycosides
	Rouge vif	0,27	Anthocyanidines 3-glycosides
	Rouge	0,44	Anthocyanidines 3-glycosides
	Bleu	0,86	
Extrait	Couleur sous l'UV	RF	Types de phenol flavonoïde possible Ben Hassine et al., (1982)
<i>Globularia alypum</i>	Rouge	0,27	lutéoline-7-glucoside
	Rouge vif	0,29	lutéoline-7-glucoside
	Rouge	0,49	lutéoline-7-glucoside

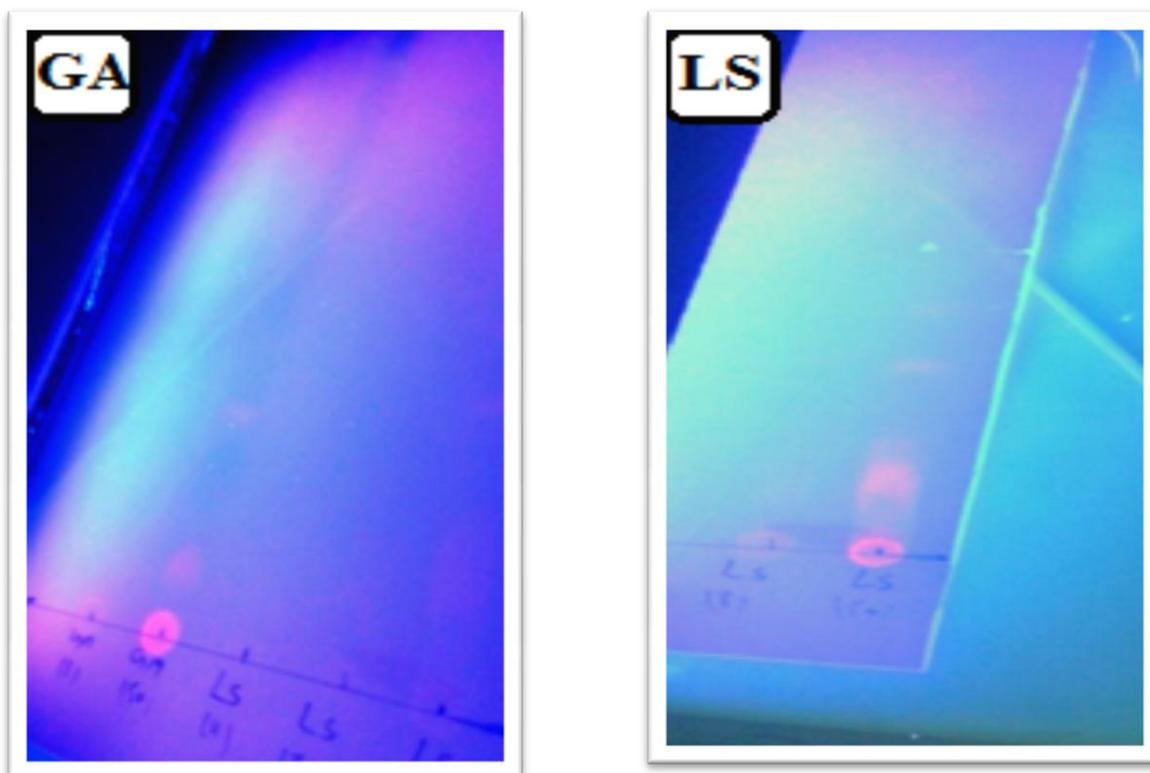


Figure 22 : Chromatographie sur couche mince des deux extraits méthanoliques

Systeme de solvant: Acétone /eau

(GA : *Globularia alypum*. LS : *Lavandula stoechas*)

➤ **Composés identifiés chez *Lavandula stoechas***

Vingt-et un composés ont été séparés par les essais réalisés avec le système de solvant n-butanol,acide acétique et eau distillée, quatre composés par acétone/eau distillé et douze composés avec le mélange des trois solvants chloroforme, méthanol et eau distillée.

Différentes classes et composés polyphénoliques ont été séparés mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des flavonols, les anthocyanidine 3-glycosides et les phénols simples.

Le premier système solvant sépare essentiellement les flavonols alors que les acides phénols sont bien séparés par les solvants : chloroforme/methanol/eau tandis que anthocyanidine 3-glycosides sont séparés par l'acétone /eau distillée.

➤ Composés identifiés chez *Globularia alypum*

Seize spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait brut par le BAW appartenant aux différentes classes polyphénoliques avec probablement une abondance des lutéoline-7-glucoside et des l'apigénine-7-glucoside.

L'investigation de la phase mobile acétone /eau distillée a conduit à l'identification de trois composants de type lutéoline-7-glucoside.

D'autre part les produits répertoriés au cours de la CCM, en utilisant le chloroforme/méthanol/eau distillée dans la phase mobile ont été neuf.

Les tests chromatographiques CCM réalisés, nous avons montré la richesse de *Globularia alypum* et *Lavandula stoechas* en produits naturels dont les effets thérapeutiques sont nombreux.

2. L'évaluation de l'activité antioxydante (DPPH)

L'activité anti radicalaire réalisée dans notre étude par la méthode du radical (2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle) DPPH qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée **Bortolomeazzi et al., (2007)**. L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extrait utilisés (l'EMLS et l'EMGA) et du témoin AA (antioxydant de référence) (0,25, 0,50, 0,75, 1...,2 mg/ml).

L'activité anti oxydante des extraits est exprimée en IC_{50} , ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats **Abdulmajed et al., (2005)**, **Ranga et al., (2009)** et **Ahmad et al., (2012)**; il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. Ces IC_{50} sont déterminées à partir des graphes (**Figure 23**). Dont l'abscisse représente la concentration des l'extraits méthanoliques et l'ordonné de l'activité antioxydant en pourcentage d'inhibition. Plus la valeur de l' IC_{50} est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

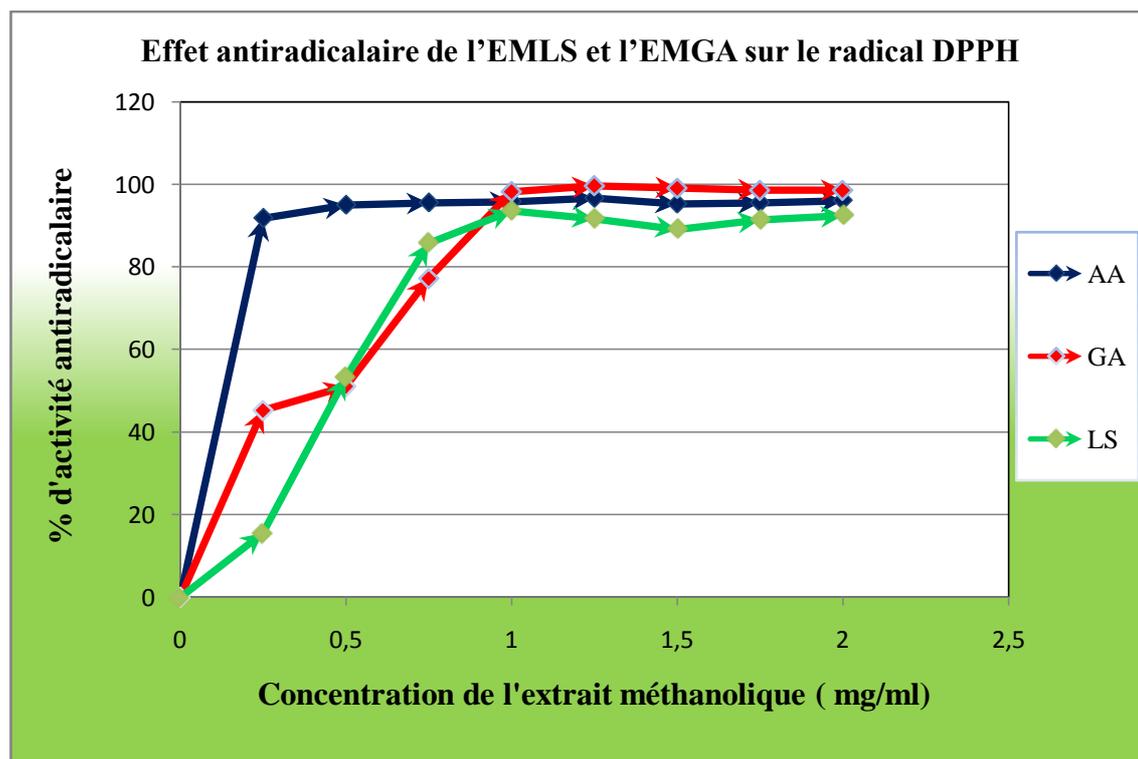


Figure 23 : Effet antiradicalaire de l'EMGA et l'EMLS sur le radical DPPH

L'EMGA présente un pouvoir antiradicalaire de (99,75 %) , un pouvoir supérieur à celui qu'exerce l'acide ascorbique (96,38 %) utilisé comme molécule de référence présentant un contrôle positif par contre l'EMLS présente un pouvoir inférieur à celui de l'AA (93,61 %) ce test nous a permis de déterminer la concentration inhibitrice piégeant (50%) du radical DPPH (IC_{50}) qui était de (0,42 mg/ml) pour *Globularia alypum* et (0,45 mg/ml) pour *Lavandula stoechas* contre (0,112 mg /ml) pour L'acide ascorbique (Figure 24).

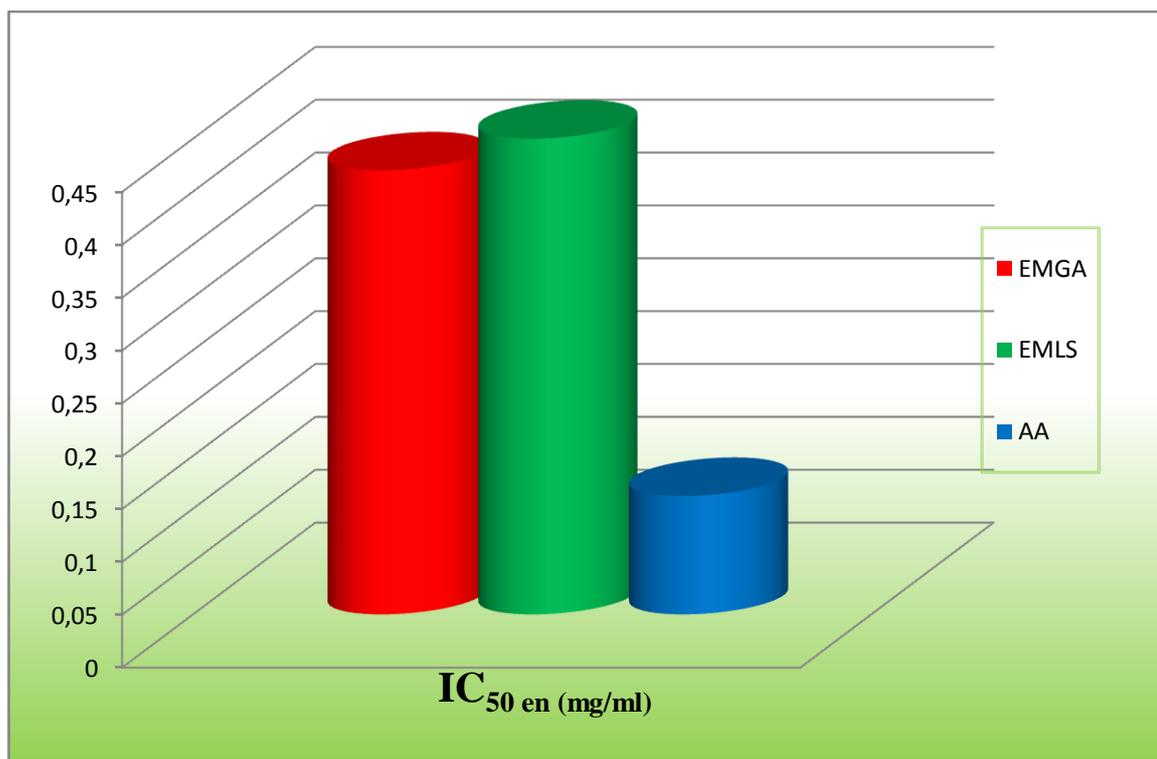


Figure 24 : Valeurs des IC₅₀ en (mg/ml) pour l'EMGA et l'EMLS et l'AA.

Notre épreuve montre que la valeur d'IC₅₀ obtenue chez *Globularia alypum* est inférieure à celle obtenue dans les études menées sur la partie aérienne de la même plante. **Daycem et al., (2011)**

Nos observations sur l'activité de piéger le radical libre DPPH par L'EMLS viennent renforcer ceux observées par **Gulçin et al., (2004)** alors que d'autres auteurs parlent du pouvoir antioxydant plus puissant telle que **Mohammedi, (2006)** appuyer sur une valeur d'IC₅₀ de (0.05mg/ml) qui justifier le pouvoir énorme de l'extrait méthanolique de *Lavandula stoechas* dans la neutralisation de DPPH.

3. Résultats de l'activité antibactérienne

3.1. Test du méthanol (test négatif)

Le test méthanol à différentes concentrations, réalisé sur les souches de référence *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp* et *Staphylococcus aureus* montre que ce solvant n'a aucun pouvoir antibactérien sur ces micro-organismes.

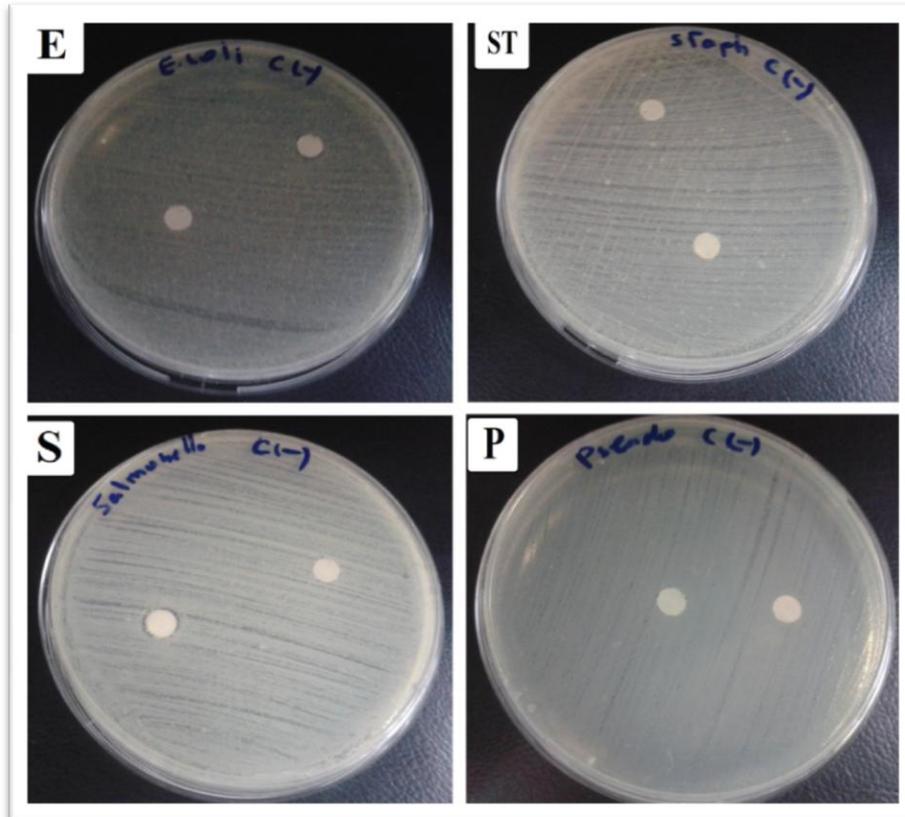


Figure 25 : Test du méthanol sur les 4 souches de références

(**ST**: *S. aureus* ATCC 25923, **S**: *Salmonella* spp, **P**: *P. aeruginosa* ATCC 27853,
E : *E. coli* ATCC 25922)

3.2. Antibiogramme

La mise en contact des différentes souches avec les antibiotiques a permis de réaliser un antibiogramme afin de déterminer le diamètre d'inhibition et par conséquent voire la sensibilité ou la résistance bactérienne vis-à-vis de ces derniers.

Les résultats de l'antibiogramme sont présentés dans la (**figure 26**) et (**Tableau 09**), on remarque que la série d'ATB testés a un effet variable sur les souches cibles, ils ont un effet inhibiteur sur certaines et sont soumis à une résistance avec d'autres.

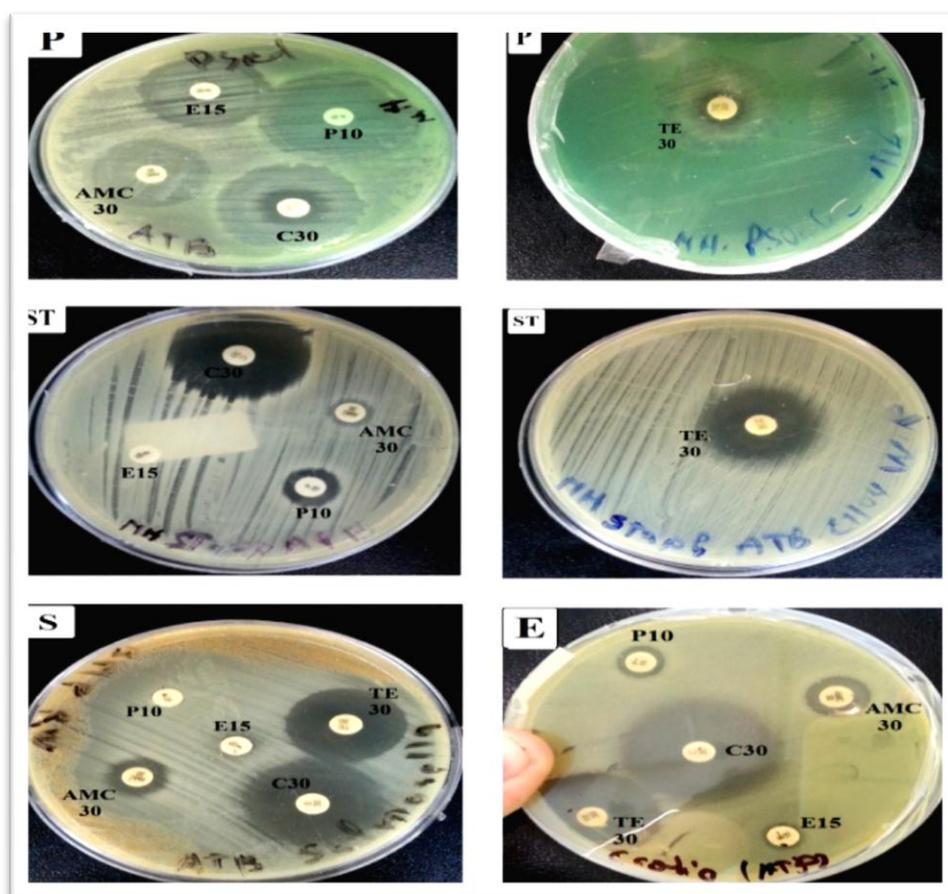
Pour le Chloramphénicol, et La Tétracycline toutes les souches se sont manifestées sensibles dont le diamètre est clairement supérieure a 23mm, Sauf qu'il ya une résistance indiquée au niveau de *P. aeruginosa* vis-à-vis ces types d'ATB.

En ce qui concerne la pénicilline, l'érythromycine et l amoxicilline + acide clavulanique, toutes les souches testées sont révélées résistantes vis-à-vis ces antibiotiques, avec des diamètres variable d'une souche à l'autre.

La résistance de la souche vis-à-vis les Béta lactamines ne peut être expliquée que par une diminution de l'affinité de la liaison d'ATB (PBP : Penicilline Binding Proteins) suite à une mutation de celles-ci ou à une diminution du nombre de PBP, la réduction d'affinité est documentée chez les Gram⁻, les deux mécanismes sont rencontrés chez les Gram⁺.

Les souches productrices de pénicillinase présentent une résistance enzymatique à la pénicilline **Louise, (2011).**

Pour les phénicolés c'est un inhibiteur à large spectre, la résistance du genre *P. aeruginosa* est liée probablement aux pompes membranaires, responsable de la résistance croisée **Ban Bamkeke et al., (2008).**



(ST: *S. aureus* ATCC 25923, S: *Salmonella* spp, P: *P. aeruginosa* ATCC 27853,
E: *E. coli* ATCC 25922)

(AMC 30: Amoxicilline+acide clavulanique 30µg, C 30: Chloramphénicol 30µg,
P 10: Pénicilline 10µg, E 15: Erythromycine 15µg, TE 30: tetracycline 30µg)

Figure 26 : Aspect macroscopique de la réponse bactérienne aux différents antibiotiques testés

Tableau 09 : Les diamètres d'inhibition des souches testées vis-à-vis des antibiotiques.

		Les diamètres d'inhibition (mm)				
ATB	Souche	Chloramphénicol 30µg (C)	Pénicilline 10µg (P)	Erythromycine 15µg (E)	Amoxicilline +acide clavulanique 30µg (AMC)	Tétracycline 30µg (TE)
	<i>S.aureus</i> ATCC 43300	29	13	0	9	24
	<i>Salmonella</i> spp	36	0	8	14	27
	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	16	0	0	0	11
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	33	10	8	12	30

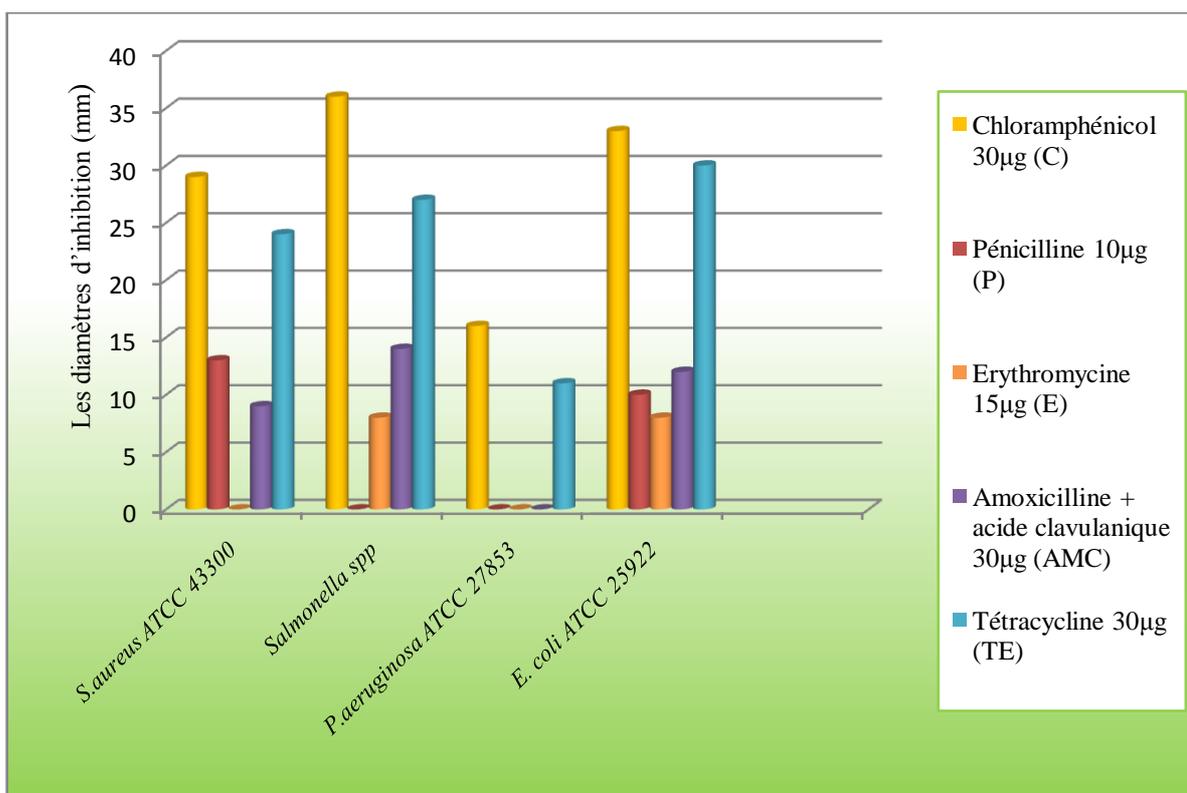


Figure 27 : Présentation graphique de l'antibiogramme

3.3. Test de l'activité antibactérienne des extraits de *Globularia alypum* et *Lavendula stoechas* sur les souches testées méthode des disques (aromatogramme)

L'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de *Globularia alypum* et *Lavandula stoechas* a été évaluée dans cette étude par la technique de diffusion sur l'agar (méthodes des disques) vis-à-vis de quatre souches bactériennes après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

3.3.1. Effet antibactérien des extraits sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

La méthode des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des extraits méthanoliques vis-à-vis des souches testées. Les zones d'inhibition sont indiquées dans le **tableau10**.

Tableau 10 : Les diamètres d'inhibition de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Concentration (mg/ml)	02	04	08	10	50	100	150	200	250	300	350	400	450
diamètre d'inhibition pour l'extrait GA (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
diamètre d'inhibition pour l'extrait LS (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0

D'après les résultats obtenus, l'EMGA et l'EMLS n'ont aucun effet antibactérien sur la *S. aureus*, ceci reflète sa résistance vis-à-vis des extraits. En revanche la concentration 400 mg/ml de l'EMLS révèle une zone de 9 mm de diamètre (**figure 28**).

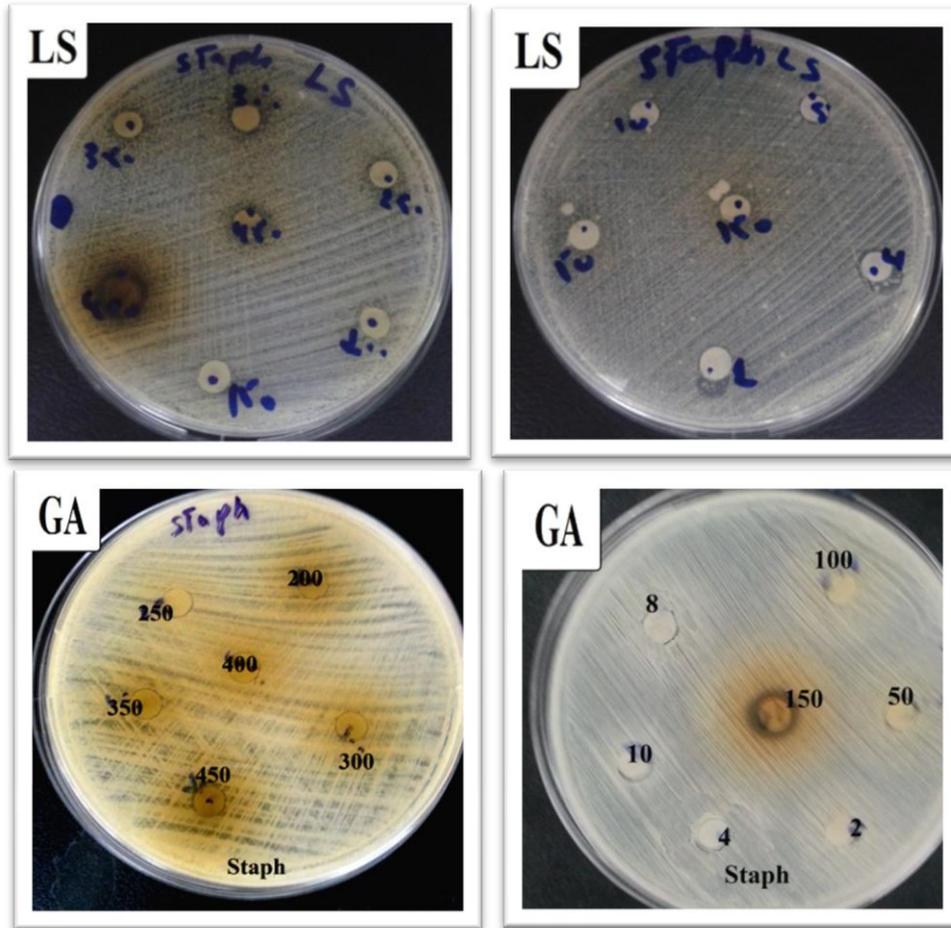


Figure 28 : Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce *S. aureus* ATCC 25923 aux extraits testés (GA : *Globularia alypum*, LS : *Lavandula stoechas*).

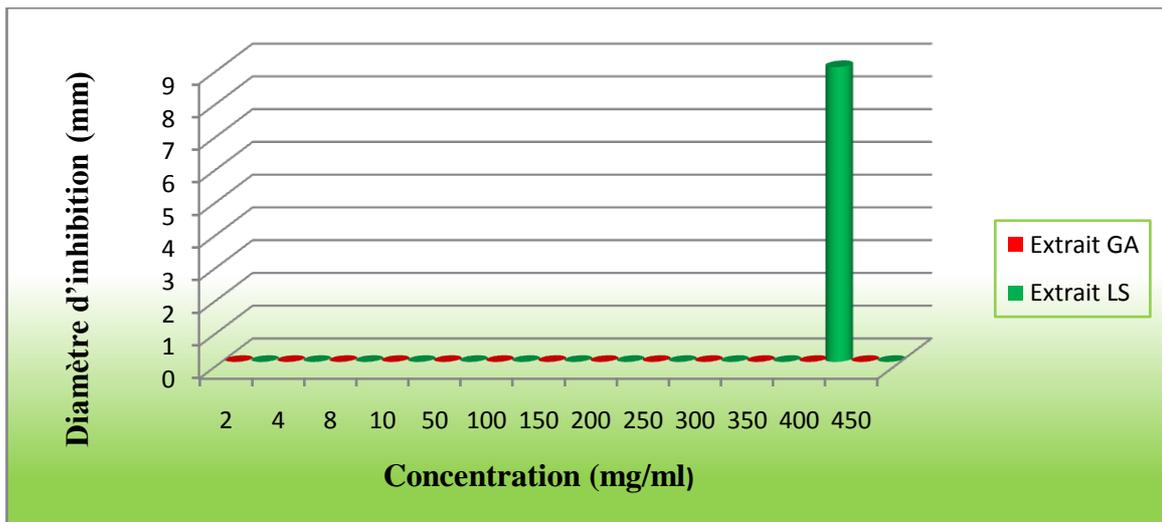


Figure 29 : Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce *S. aureus* ATCC 25923 (GA : *Globularia alypum*, LS : *Lavandula stoechas*)

3.3.2. Effet antibactérien des extraits sur *Escherichia coli* ATCC 25922

Les résultats relatifs à l'aromatogramme de la souche *E. coli* montrent l'absence des zones d'inhibition de la bactérie en réponse à la gamme des concentrations des extraits des plantes testés. (tableau11), (figure 30).

Tableau 11 : Les diamètres d'inhibition de la souche *E. coli* ATCC 25922.

Concentration (mg/ml)	02	04	08	10	50	100	150	200	250	300	350	400	450
diamètre d'inhibition pour l'extrait GA (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
diamètre d'inhibition pour l'extrait LS (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

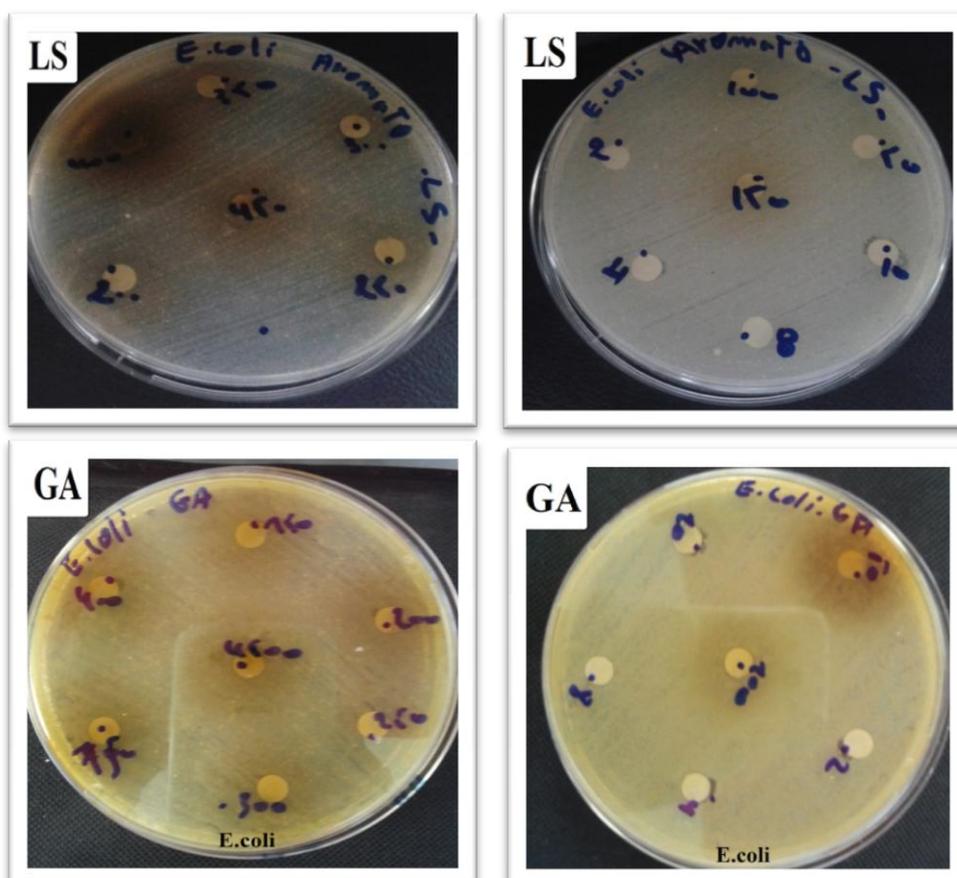


Figure 30 : Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce d'*E.coli* ATCC 25922 aux extraits testés

(GA : *Globularia alypum*, LS : *Lavandula stoechas*).

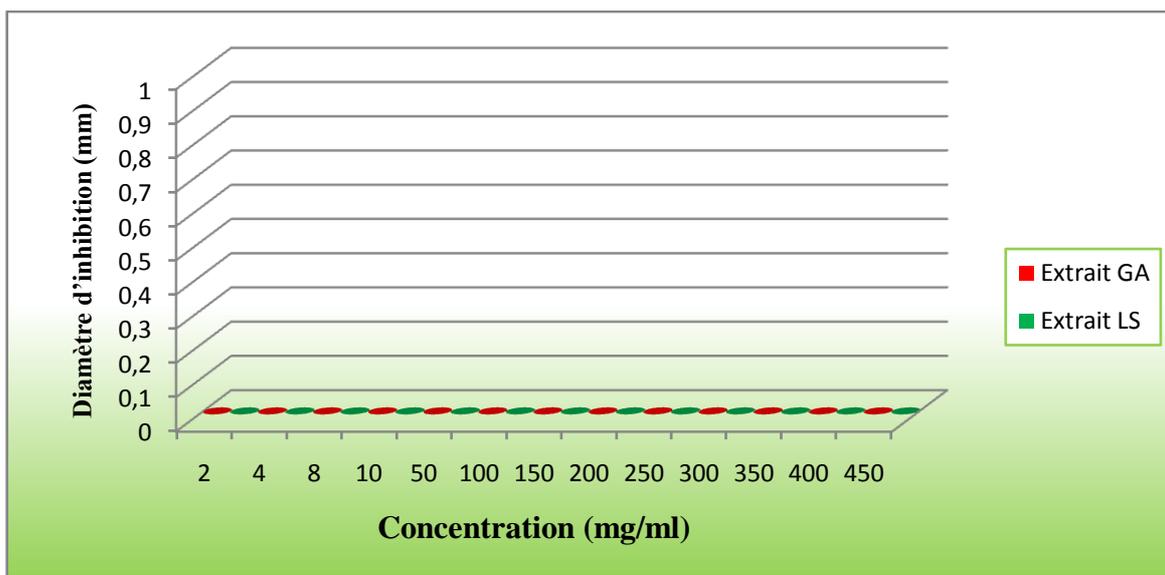


Figure 31 : Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce d'*E.coli* ATCC 25922
(GA : *Globularia alypum*, LS : *Lavandula stoechas*)

3.3.3. Effet antibactérien des extraits sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

L'évaluation de l'effet antibactérien des extraits des plantes testés sur *Pseudomonas aeruginosa* montrent l'absence des zones d'inhibition de la bactérie en réponse à la gamme des concentrations utilisées (tableau 12), (figure 32).

Tableau 12 : Les diamètres d'inhibition de la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Concentration (mg/ml)	02	04	08	10	50	100	150	200	250	300	350	400	450
diamètre d'inhibition pour l'extrait GA (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
diamètre d'inhibition pour l'extrait LS (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

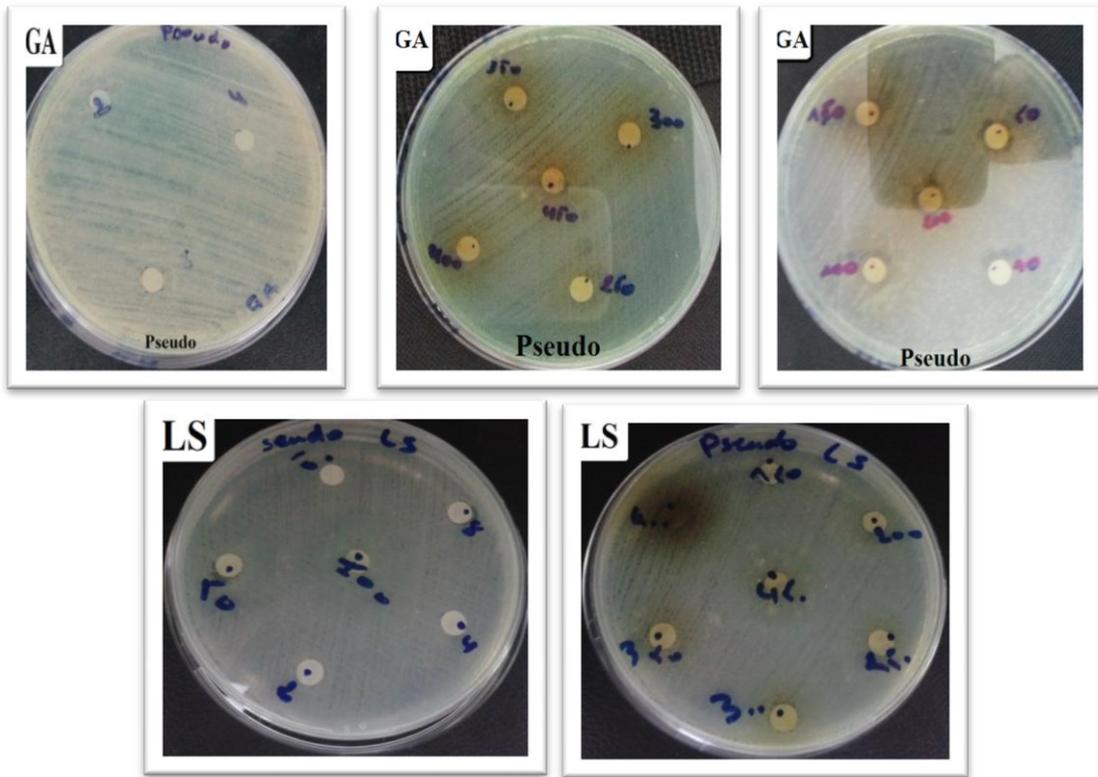


Figure 32 : Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce *P. aeruginosa* ATCC 27853 aux extraits testés (GA : *Globularia alypum*, LS : *Lavandula stoechas*)

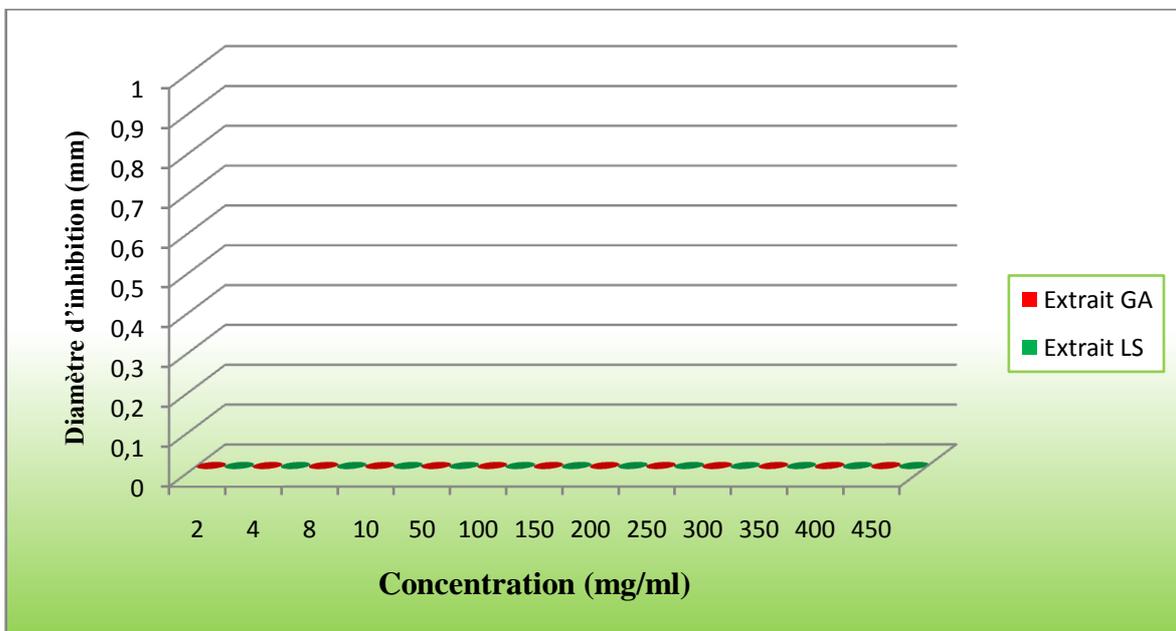


Figure 33 : Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce *P. aeruginosa* ATCC 27853

(GA : *Globularia alypum*, LS : *Lavandula stoechas*)

3.3.4. Effet antibactérien des extraits sur *Salmonella spp*

Les résultats relatifs à l'aromatogramme de la souche *Salmonella spp* montrent aussi que les deux extraits n'ont aucun effet sur la bactérie et ceci d'après l'absence des zones d'inhibition. (tableau13), (Figure34).

Tableau 13 : Les diamètres d'inhibition de la souche *Salmonella SPP*.

Concentration (mg/ml)	02	04	08	10	50	100	150	200	250	300	350	400	450
diamètre d'inhibition pour l'extrait GA (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
diamètre d'inhibition pour l'extrait LS (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

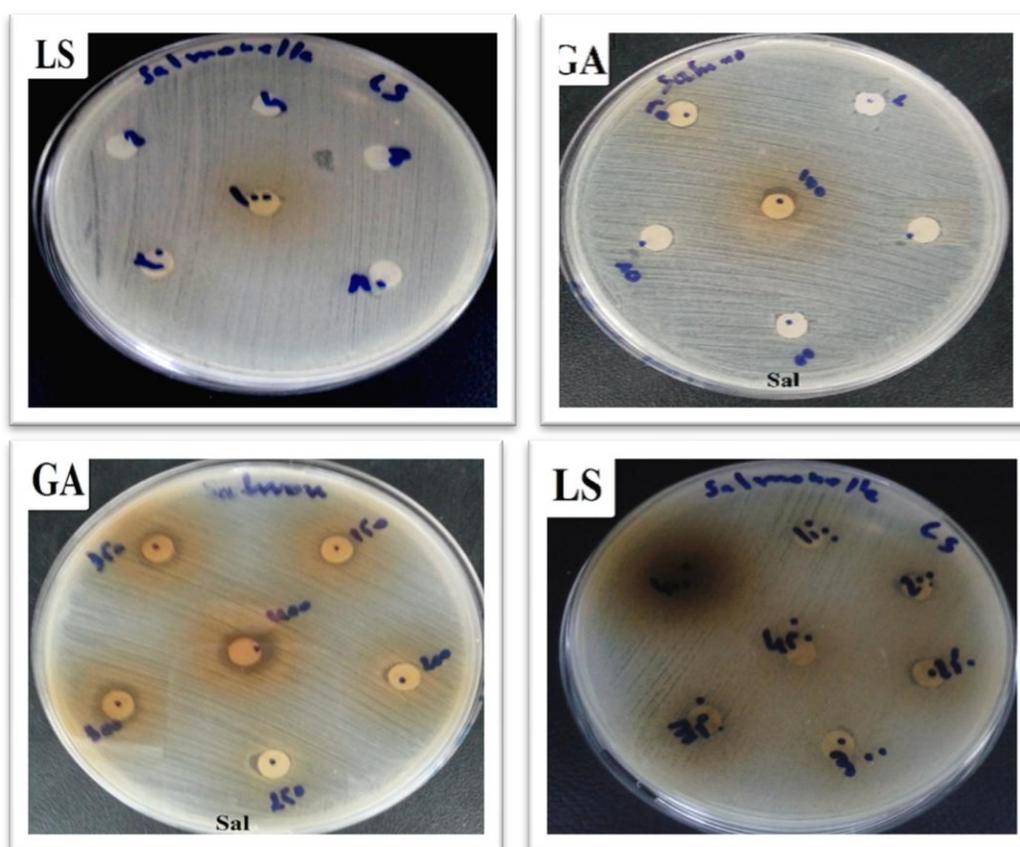


Figure 34 : Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce *Salmonella Spp* aux extraits testés

(GA : *Globularia alypum*, LS : *Lavandula stoechas*)

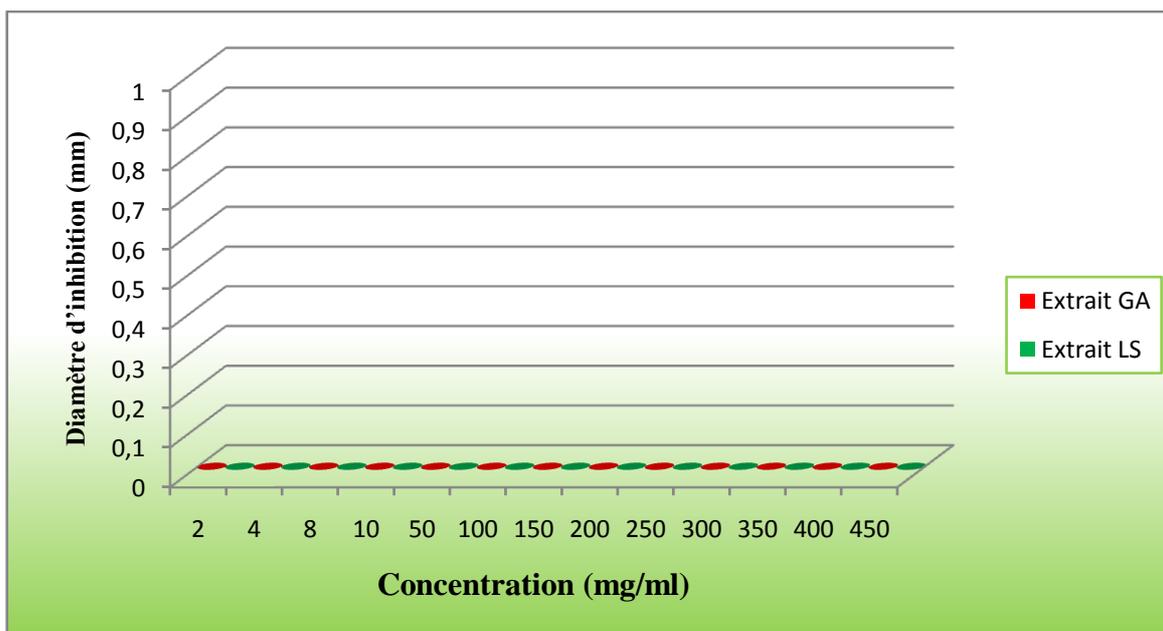


Figure 35 : Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce *Salmonella Spp* (GA : *Globularia alypum*, LS : *Lavandula stoechas*)

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que l'extrait méthanolique de *Globularia alypum*, et de *Lavandula stoechas* n'a aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches bactériennes testées. A l'exception l'apparition d'une zone de 9mm chez *Lavandula stoechas* (400mg/ml) vis-à-vis la souche de *Staphylococcus aureus*.

Les résultats de notre épreuve sont en accord avec les résultats **mohammedi, (2006)** et de **Balouiri, (2011)** ou l'extrait méthanolique de *Lavandula stoechas* n'a présenté aucun effet antibactérien via les souches testées parmi eux (*E.coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*).

Alors que nos résultats ne sont pas en accord avec ceux trouvés par **Goren et al, (2002)**, qui ont constaté une très bonne activité antibactérienne de Huiles essentiels de *Lavandula stoechas* ou ils ont obtenu des zones d'ihnhibition de 22mm, 23mm, 25mm vis-à-vis respectivement *S.aureus*, *E.coli* et *P,aeruginosa*.

Plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude du pouvoir antimicrobien des extraits méthanoliques et éthanoliques de *Lavandula stoechas* **Abdel-Massih. R et al., (2010)** **Celiktas. Y. O et al., (2007)** qui affirment que l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques est faible par rapport à celle des huiles essentielles.

La résistance des souches peut être attribuée à plusieurs mécanismes plasmidiques ou chromosomiques tels que : les modifications enzymatiques de la cible, diminution

d'affinité, des mutations ou même dans notre cas les concentrations sont faibles pour exercer un pouvoir positif sur la souche.

Il faut rappeler que l'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration des principes actifs. **Wagner, (1993) ; Thangara et al., (2000).**

A partir des résultats de l'antibiogramme tirés, on peut dire que les extraits de *Lavandula stoecha* et *Globularia alypum* n'ont aucun effet par rapport aux molécules de synthèse testées (antibiotiques) sur la majorité des souches.

Les conditions de séchage et de broyage au cours de l'extraction peuvent être aussi à l'origine de l'absence de l'activité antibactérienne. Il est rapporté par **Seidel, (2005)** que si la plante est connue par son contenu en composés volatiles ou thermolabiles, il est conseillé de congeler le matériel végétal le plutôt possible après sa collection.

Malgré que la plante *Globularia alypum* n'a pas donné une activité antibactérienne selon nos résultats et les résultats de **Bournine, (2013)** mais elle reste une plante qui possède plusieurs propriétés pharmacologiques ; hypoglycémiant **Zerriouh, (2008)**, antituberculeuse, en plus elle est utilisée dans le traitement de la fièvre intermittente **Ferhi et Aiache, (2010).**

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes ainsi que l'effet antioxydant et antibactérien des extraits méthanoliques de la partie aérienne de *Globularia alypum* (Tesselgha) et de *Lavandula stoechas* (El halhal) ont été évalués dans le présent travail.

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence des Saponosides, des Tanins, des flavonoïdes, des Mucilages et des Coumarines avec une absence des Alcaloïdes chez les deux plantes.

Les résultats ont montré que les deux extraits méthanoliques sont riches en composés polyphénoliques avec la prédominance de ces derniers dans l'extrait méthanolique de *Lavandula stoechas*.

Les tests chromatographiques CCM réalisés, ont montré la richesse de *Globularia alypum* et *Lavandula stoechas* en produits naturels dont les effets thérapeutiques sont nombreux.

Par ailleurs, les deux extraits ont possédé une activité antioxydante importante *in vitro*. Ils ont montré une inhibition très importante vis-à-vis du radical DPPH.

En outre les extraits méthanoliques de *Globularia alypum* et *Lavandula stoechas* n'ont pas possédé un effet antibactérien vis-à-vis les souches testées sauf une faible zone de 9mm de diamètre révélée chez *Lavandula stoechas* en (400mg/ml) sur la souche *S. aureus*.

Globularia alypum et *Lavandula stoechas* sont des sources prometteuses d'agents antioxydants et vont encourager l'utilisation raisonnable de ces plantes dans la technologie et la transformation alimentaires, ainsi qu'en médecine.

Par contre ses effets antibactériens restent non confirmés. Pour cela d'autres études concernant l'identification des molécules bioactives, la confirmation de la capacité antioxydante de *Globularia alypum* et de *Lavandula stoechas* par des tests *in vivo* ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits et des huiles essentielles de ces deux plantes vis-à-vis d'autres souches bactériennes sont nécessaires.

- **Abdel-Massih. R.(2010)** ,Antibacterial Activity of the Extracts Obtained from *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*,and *Trigonella foenum-graecum* on Highly Drug-Resistant Gram Negative Bacilli; *Journal of Botany*, Article ID 464087, 8 pages, doi:10.1155/2010/464087
- **Abdulmajed K., McGuigan C. and Heard C. M.(2005)**. Topical delivery of retinyl ascorbate: 4. Comparative anti-oxidant activity towards DPPH. *Free Radic. Res.*39: 491-498
- **Ahmad N., Fazal H., Abbasi B. H., Anwar S. And Basir A.(2012)**. DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum* L.). *Toxicol. Ind. Health*.
- **Amjad Hossain M. (2005)**. Neem Seed oil: Bangladesh, Examples of the Development of pharmaceutical Products from Medicinal Plants. Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research (BCSIR) 10. P: 59-63.
- **Aravodis E., 2005**. Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, **4** (2):128-133.
- **Asada Y., Oshikawa T., Welli. (1998)**. Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Planta medica*. 64(8). P: 746.
- **Balouiri Mounyr. (2010-2011)**. Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de trois extraits de Plantes Médicinales et Aromatiques cultivées dans le jardin de l'institut national des plantes médicinales et aromatiques –Taounate. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.
- **Bahorun T. (1997)**. Substance Naturelles Actives: La Flore Mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural research council, réduit, Mauritius.
- **Ben Hassine.B ., Bui.A.,Mighri.Z., Cave .A.(1982)**,plantes medicinal et phytothérapie.16(3). 197-205
- **Ben Mansour R., Gargouri B., Elloumi N., Ben Haj J. I., Gharbi-Gammar Z., Lassoued S. (2012)**. Investigation of antioxidant activity of alcoholic extract of *Globulaire alypum* L. *Journal of Medecinal plants Research* 6(25): 4193-4199.
- **Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R. and Pizzariello A. (2007)**. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by

- crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chem.*; 100: 1481-1489.
- **Besombes. C. (2008).** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat.
 - **Bouchikhi Tani Zoheir.(2011).** Lutte contre la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae) et la mite *Tineola bisselliella* (Lepidoptera, Tineidae) par des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles. université abou bekr belkaid Tlemcen
 - **Bournine Lamine.(2013).** Effet anti-inflammatoires, antioxydantes et antibactérien des substances actives de *Globularia alypum L.* université abde rrahmane Mira Néjaia
 - **Bousseboua H. (2001, 2006).** Eléments de microbiologie générale. 32, P : 160-167.
 - **Boutiti Ameer.(2007).** Etude photochimique de l'espece *Globularia alypume* , université Mantouri constantine, P : 30
 - **Bozin.B, N., Mimica - Dukic, I., Samojlik, A., Goranand R. (2008).** Igc, Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativumL.*, Alliaceae), *Food Chemistry*, 111: P. 925-929.
 - **Catier O., Roux D. (2007)** Botanique Pharmacognonsie Phytothérapie.3ème edition. WOLTERS KLUWER: 13.
 - **Chambers H. F. (1997).** Methicillin resistance in *staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10. P: 781.
 - **Chaudhuri, R.K., Sticher, O.,(1979).**Structure of two highly oxygenated iridoid glucosides from *Globularia alypum*, *Tetrahedrom Letters* 54, 3149-3152.
 - **Chaudhuri, R.K., Sticher,O.,(1981)** .New iridoid glucosides and a lignan diglucoside from *Globularia alypum* ,*Helvetica Chimica Acta* 64,3-15.
 - **Celiktas. Y. O. (2007)** . Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations; *Food Chemistry* 100 ,553–559
 - **Cohen .J. H., Kristal .A. R. and Stanford J L (2000).** Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, **92**, 61-68.
 - **Dacosta Y., 2003.** Les phytonutriments bioactifs. Yves DACOSTA (Ed). Paris, P : 317.

- **Dastidar S.G. (2004).** Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23.P: 99-102.
- **Dunster J., Dunster K. (1996).** Dictionary of natural resource management: the comprehensive, single source guide to natural resource terms. UBC : 343-344.
- **Durackova Z., Djrolo F., Hougbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N., Avimadj M. (2008).** Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine* Gvozdkakova A (ed). P : 19-43.
- **Daycem Khlifi ., Moktar Hamdi ., Akrem El Hayouni ., Sylvie Cazaux ., Jean Pierre Souchard ., François Couderc et Jalloul Bouajila.(2011).** Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts of *Globularia alypum L.* (Globulariaceae) Leaves. *Molecules Vol 16*
- **Edeoga1 H.O., Okwu D. E., Mbaebie B.O. (2005).** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (7). P: 685-68.
- **El-Hilaly. J, Hmammouchi. M, Lyoussi. B; Ethnobotanical** studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco); *Journal of Ethnopharmacology* 86 (2003) 149–158.
- **Es-Safi N., Kollman A., Khlifi.S., Ducrot P.H.(2007).** Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum L.* Structure-activity relationships. *LWT-Food.Sci.Technol.*, 40:1246-52.
- **Es-Safi N ., Khalifi S., Kerhoas L., Kollman A ., El Abbouyi A ., Ducrot P.H.(2006).** Iridoid glucosides from the aerial parts of *Globularia alypum L.* (Globulariaceae). *Chem.Pharm .Bul.*, 54:85-8.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique.* 108-115.
- **Ferhi B., Aiache J-M. (2010)** Effet of *Globularia alypum L.* on the gastrointestinal tract. *Journal of Natural Products* 3 : 141-146.
- **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I. (2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102.P : 898.

- **Georgé S., Brat P., Alter P Etamiot J.M. (2005).**Rapid determination of polyphénols and Vitamin C in plant-derived products. *J. Agr. Food Chem.* 53, P: 1370-1373.
- **Goren A.C., Topciu G., Bilsela.G., Bilsela M.,Aydogmus. Z.,et pezzuto. J.M.(2002).** The Activity of Essetial Oil of *Lavandula stoechas ssp Stoechas.z. naturforsh.* 57c.797-800
- **Guillaume, 2000:** Www. Second euro-bioweb.com/microbiologie/ microbiologie cours.Html.
- **Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. P : 71-75.
- **Gulcia.I., Uguz.M.T.,Oktary.M., Beydemir.S., et Kufrevioglu.O.I.(2004).** Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of clary sage (*Salvia sclarea L.*).*Turk J Agric.*28,25-33.
- **Halliwell B., 1999.** How to characterize a biological antioxydant free radical. *Res.Comm,* 9:1-32.
- **Hamidi, Abdelrazag.** Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum* [en ligne]. Thèse de magister. Ouargla : université Kasdi Merbah,2013,P:86.disponiblesurhttp://bu.univouargla.dz/HAMIDI_ABDELRAZAG.pdfidthese=3070 (consulté le 18/04/2015).
- **Hanene Jrah Harzallah., Aicha Neffati., Ines Skandrani., Eya Maaloul., Leila Chekir- Ghedira et Touhami Mahjoub.(2010).** Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts, *Full Length Research Paper* , Faculté de Pharmacie, Monastir, Tunisia.
- **Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam P.S. (2010).** *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41. P: 1070-1078.
- **Jouad .H., Maghrani. M., Eddouks. M., (2002).** Journal of Ethnopharmacology 81 351-356.
- **Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogugbuaja V.O. (2004).** Identification of active principles of *M. balsamina* (balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci;* 4(3). P:179-182.

- **Khelifi S., El Hachimi Y., Khalil A., Es-Safi N., El Abbouyi A. (2005)** In Vitro antioxidant effect of *Globularia alypum L.* hydromethanolic extract. *Indian. J. Pharmacol* 37(4): 227-231.
- **Kohen R., Nyska A., 2002.** Oxidation of biological systems, oxidative stress phenomena, Antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30:620-650.
- **Laib Imène . (2011)** . Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro Alimentaires, INATAA, Université de Constantine Mentouri.
- **Lee K.W.,KIM Y.J.,Lee H.J. et Lee C .Y.(2003).**Cocoe Has More phenolic phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red wine.*J.Agric Food Chem*,51,7292-7295.
- **Lesueur D., Serra D.de Rocca, Bighelli A., Hoi T.M., Ban N.K., Thai T.H., Casanova J. (2007).** Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Michelia faveolata* Meryll ex Dandy from Vietnam *Flavour and Fragrance Journal*, 22, P: 317-321.
- **Li h.b., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F et Jiang Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae.*Foodchem.* 102. P: 771-776.
- **Louis Michel., (2010-2011)** . grand noble lycée des matière de tertiaire, de la santé et de sociale . page 07.
- **Maio, G.D., panizzi, L., (1966)** .Structura della *globularina*, *La Ricerca Scientifica* 36,845-850.
- **Markeram.K.R(1982).** Technique of flavonoide Identification Biological techniques Series .Ed Trecherne J.E.et Rubery P.H.Academic Press.P:113
- **Merghache S., Zerriouch M., Merghache D., Tabti B., Djaziri R., Ghalem S.(2013)** .Evaluation of hypoglycaemic and hypolipidemic activities of *Globularin* isolated from *Globularia alypum L.* in normal and streptozotocininduced diabetic rats. *Journal of Applied Pharmacol Science* 3(04) : 001-007.

- **Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E et Kefalas P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*); *Food Chemistry* 89. P: 411-420.
- **Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, P: 155.
- **Narayana K.R. (2000).** Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and therapeutic Potentiel. *Indian Journal of pharmacology* P: 33:2-13.
- **Nataro J. P., Kaper J. B. (1998).** Diarrheogenic *E. coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11. P : 142.
- **Nostro A., Gennano M. p., D'Angelo V., Marino A. et Cannatelli M.a. (2000)** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliquée.* 30 (5), P: 379.
- **Okmu D.E. (2005).** Phtychemicals, vitamins and mineral contents of two Nigerian medicinal plants. *Int J Mol Adv Sci;* 1 (14). P: 375-381.
- **Porter N. (2001).** Essential oils and their production. *Grop & food Rasearh.* P: 39.
- **Perry J., Staley J., Lory S et al. (2002).** Microbiologie. Cours et question de révision. Dunod. P : 159.
- **Philippon A. (1995).** Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques. *Lett. Infectiol.* 10. P : 619.
- **Quezel .P., Santa.S., (1963) .** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et Méridionales, tome II .CNRS, Paris. P.860.
- **Ranga R. R., Tiwari A. K., Prabhakar R. P., Suresh B. K., Ali A. Z., Madhusudana K. and Madhusudana R. J. (2009)** New furanoflavanoids, intestinal alpha-glucosidase inhibitory and free-radical (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam.). *Bioorg. Med. Chem.*17: 5170-5175.
- **Rizk, A.M. (1982).** Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterrapia,* 52 (2).P: 35-42.
- **Svoboda K.P., Hampson J.B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic Plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other

pharmacological activities Plant Biology Department, SAC Auchincruive, AyrScotland, UK, KA65HW.

- **Sanchez-Moreno C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*.8. P: 121-137.
- **Schnaubelt K. (1998).** Advanced Aromatherapy. Vermont:Healing Arts Press.
- **Sebai . M .,Boudali. M .(2009/2012).** La phytothérapie a la confiance et mefiance , Institut de formation paramédical CHETTIA,
- **Seidel V (2005).** Initial and Bulk Extraction. *In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 27-37*
- **Thagara J. H. S., ADJEI O., ALLEN B. W., PORTAELS F. et al. (2000).** *In vitro* activity of ciprofloxacin, Sparfloxacin, Ofloxacin, Amikacin and Rifampicin against Ghanian isolates of *Mycobacterium ulcerans* ; J. Antimicrob. Agents Chemother, 45 (2), 2000, P : 231-233.
- **Torres R. (2006).** Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of *Haplopappusmultifolius*; *Phytochemistry* 67. Ed: ELSEVIER. P: 984-987.
- **Wagner H. (1993).** Pharmazeutische Biologie. Drogen und irhe inhaltsstoffe, Gustav Fisher Verfag. Sturtgart-New-York, P : 522.
- **Yrjonen . T (2004).** Etraction and planar chromatographic.Separation Techniques in the analysis of natural prodercts conference.Faculty of pharmacy of the university of Helsink.P: 64
- **Yi z-b., Yu y., Liang Y-Z., Zeng B. (2007).** In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of Pericarpium Citri Reticulatae of new Citrus cultivar and its main flavonoids, LWT-Food of Science and Technology. 4. P: 1000-1016.
- **Zaghada Fatima Zahra. (2008-2009).** Activité analophatique et Analyse phytochimique .Université Oran E-Sania.
- **Zerriouh Meriem. (2008).** Contribution a l'utude de l'activité antidiabétique de globularine,un iridoide isolé de feuilles de *Globularia alypum* le rat wistar.Université Aboubeker bel kaid Tlemcen.P : 32-47

- **Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food chemistry*, 64 (4). P: 555-559.

Annexe 1

1. Matériel screening phytochimique

➤ Les produits Chimique et les réactifs :

- H_2SO_4 , Réactif de MAYER, Réactif de WAGNER, acide chlorhydrique, NaOH, NH_4OH , chlorure ferrique ($FeCl_3$), HCl
- Réactif de Stiasny, $FeCl_3$, Ethanol, l'éther de pétrole, chloroforme, méthanol phosphotungstic (WO_4^{-2}), phosphomolybdic (MoO_4^{-2}).
- Réactif de Folin, carbonate de sodium Na_2CO_3 , l'acide gallique, $AlCl_3$, la quercétine
- BAW, DPPH, L'acide ascorbique.

➤ Les équipements

- Rotavapor R-215 (Büchi).
- Lyophilisateur.
- Spectrophotomètre (JENWAY 6305).
- Cuve de chromatographie.
- Balance (BB310) et (Sartorius).
- balance de précision (Explorer® Pro).
- Verrerie.
- Eppendorf.
- Tubes capillaires.
- Agitateur Vortex (snijders 34524).

2. Matériel bactériologique

➤ Produit utilisés

- Méthanol, L'eau physiologique Gélose Nutritive, Gélose de Mueller Hinton

➤ Les équipements

- Autoclave
- Four Pasteur
- Etuve
- Verrerie
- Réfrigérateur

Annexe 2

1. Solutions préparées

- **Réactif de MAYER** : 5 g de KI et 1,358 g de HgCl₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée.
- **Réactif de WAGNER** : 2 g de KI et 1,27g d'I₂ solubilisé dans 100 ml d'eau distillée.
- **Réactif de Stiasny** : 10 ml de formol à 40 % et 5 ml d'HCl concentré.
- **L'eau physiologique** : L'eau physiologique est une solution à 9%, 9g de NaCl pour 1litre d'eau distillée.

Après préparation, stériliser cette solution et la conserver à 4°C jusqu'à son utilisation.

2. Préparation des milieux de cultures

➤ **Gélose Nutritive**

Dissoudre 39g dans un litre d'eau distillée, autoclaver 15 à 121°C. Ensuite conserver dans un endroit frais en absence d'humidité.

➤ **Gélose de Muller Hinton**

Gélose Muller Hinton (38 g) plus 1L d'eau distillée. Porter à ébullition avec agitations jusqu'à la dissolution complète de la poudre. La solution a ensuite été stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 30 min.