



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la

Recherche Scientifique Université Larbi Ben

M'hidi Oum El-Bouaghi

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la

Nature et de la Vie

N° d'ordre :

N° de série :

\*\*\*\*\*



## Thèse

En vue de l'obtention du diplôme

De Doctorat en Sciences

Option : Biologie végétale

## Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante, antimicrobienne et antidiabétique des composés phénoliques d'une plante médicinale *Globularia alypum* L. dans la région de Laghouat**

Présentée par :

M<sup>me</sup>. KRAZA Lamia

Devant le Jury :

**Mr. Zellagui Amar**

Professeur Université – Oum  
El Bouaghi

Président

**Mr. Senoussi Mohammed  
Mourad**

Professeur Université – Oum  
El Bouaghi

Directeur de thèse

**Mr. Mergham Rachid**

Professeur Université  
Constantine 1

Examineur

**Mr. Dehimat Laid**

Professeur Université  
Constantine 1

Examineur

2020-2021

## *Dédicaces*

*À la mémoire de mon père ;*

*À ma chère maman et toute ma famille ;*

*Pour leur présence et le soutien de tous les instants qu'ils m'ont apportés, avec toute mon affection et ma reconnaissance*

*Un merci très spécial, à mon mari Dr Ouchenane Djamel pour sa patience et surtout pour son appui inconditionnel. Merci d'être à mes côtés dans les moments les plus difficiles de ma vie....*

*A mes enfants Mouhamed Nour El Islam et Achwak Malak*

*A mes Chers frères et mes chères sœurs*

*À mes collègues*

*À tous ceux qui me connaissent*

*À tous ceux qui aiment la science*

*Je dédie ce modeste travail*



## *Remerciements*

El Hamdelellah, le Miséricordieux pour m’avoir donné la Foi, la volonté et le courage d’atteindre mon objectif.

Au terme de ce travail je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation, notamment celles dont les noms n’apparaissent pas sur cette page.

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans les Laboratoires du Département de Biologie, de l’Université Amar Telidji - Laghouat, dont je remercie le chef de département Professeur *Chaibi Rachid* pour l’accueil et les conditions matérielles et scientifiques qui m’ont été offertes.

La supervision scientifique de ce travail a été assurée par Monsieur *Senoussi Mourad*, Professeur à l’Université l’Arbi Ben M’hidi Oum El Bouaghi. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance ainsi que ma gratitude pour sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et son intérêt pour mon sujet de recherche. Ce fut un honneur de travailler avec vous.

Mes remerciements vont également aux honorables membres de jury, qui ont accepté d’évaluer mon travail. Je remercie Monsieur *Zellagui Amar* de l’Université Larbi Ben M’hidi. Oum El Bouaghi, pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse.

Je remercie également les examinateurs Monsieur *Mergham Rachid* et Monsieur *Dehimat Laid* de l’Université Des Frères Mentouri. Constantine1.

J’adresse mes remerciements au responsable des Laboratoires du Département de Biologie : M. *Mustapha Hadjoudja* et à tous les ingénieurs des labos pour leurs aides inestimables.

Mes plus profonds remerciements sont adressés à mes amies et collègues *Boussoussa Hadjer* et *Khacheba Ihen* pour leur aide précieuse durant ma pratique et leurs encouragements continus. Merci infiniment.

Enfin, j’adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m’ont toujours soutenu et encouragé durant la réalisation de ce travail.

Merci à vous tous.

## Résumé

---

### **Evaluation de l'activité antioxydante, antimicrobienne et antidiabétique des composés phénoliques d'une plante médicinale *Globularia alypum* L. dans la région de Laghouat.**

---

Ce travail s'inscrit dans la cadre d'une contribution à la valorisation du règne végétale comme source de substances bioactives naturelles, pour découvrir de nouveaux composés d'intérêt thérapeutique. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'extraction et à l'analyse des extraits phénoliques de l'espèce *Globularia alypum* L., ainsi qu'à l'étude de leurs effets biologiques vis-à-vis l'activité antioxydante, l'activité antimicrobienne et leurs effets inhibiteurs des deux enzymes de la classe des hydrolases ( $\alpha$  – amylase et  $\alpha$  – glucosidase) responsables de la digestion des sucres.

La teneur en phénols totaux est comprise entre 1,36 et 14,84 mg en équivalent d'acide gallique / g de la matière sèche. Tandis que la teneur en flavonoïdes exprimée en équivalent de la quercétine est comprise entre 0,31 et 4,54 mg / g.

Les résultats de l'activité antioxydante déterminée par les tests DPPH et phosphomolybdate ont montré un bon pouvoir antioxydant par rapport aux antioxydants standards.

L'effet antimicrobien des extraits a été déterminé sur 5 souches bactériennes et 3 souches fongiques par deux méthodes différentes (méthode de diffusion sur l'agar, et méthode de contact direct) respectivement, les résultats ont révélé que les extraits : acétate d'éthyle et butanol de l'extraction hydro-alcoolique ont le plus large spectre d'activité contre la plupart des souches pathogènes testées. Par contre, l'extrait aqueux a montré une modeste activité.

Tous les extraits ont montré des effets inhibiteurs sur les deux enzymes, avec des pourcentages d'inhibition qui varient de 8,38 % à 61,65 % pour l' $\alpha$  – amylase et de 12,52 % à 71,22 % pour l' $\alpha$  – glucosidase dont la meilleure inhibition a été enregistré pour l'extrait butanolique avec une valeur d'IC<sub>50</sub> = 0,22 mg / ml).

---

**Mots clés :** *Globularia alypum* L., composées phénoliques, effet inhibiteur, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

## Abstract

---

### **Evaluation of the antioxidant, antimicrobial and antidiabetic activity of phenolic compounds of a medicinal plant *Globularia alypum* L. in the region of Laghouat**

---

This work is in keeping with the general pattern of bringing one's contribution to the development of the vegetable reign as a source of natural bioactive substances to discover new compounds of therapeutic interest. . In this study, we were interested in the extraction and analysis of phenolic extracts from the species *Globularia alypum* L., as well as in the study of their biological effects concerning antioxidant activity, antimicrobial activity and their inhibitory effects on the two enzymes of the hydrolase class ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase) responsible for sugar digestion.

The total phenol content ranges from 1.36 to 14.84 mg gallic acid equivalent/g dry matter. While the flavonoid content expressed as quercetin equivalent is between 0.31 and 4.54 mg/g.

The results of the antioxidant activity determined by DPPH and phosphomolybdate tests showed a good antioxidant capacity compared to antioxidants taken as reference.

The antimicrobial effect of the extracts was determined on 5 bacterial and 3 fungal strains by two different methods (agar diffusion method, and direct contact method) respectively, the results revealed that the extracts: ethyl acetate and butanol obtained from the hydroalcoholic extraction have the broadest spectrum of activity against most of the pathogenic strains tested. In contrast, the aqueous extract showed modest activity.

All extracts showed inhibitory effects on both enzymes, with inhibition percentages ranging from 8.38% to 61.65% for  $\alpha$ -amylase and from 12.52% to 71.22% for  $\alpha$ -glucosidase with the best inhibition recorded for the butanolic extract with an  $IC_{50}$  value = 0.22 mg / ml).

---

**Keywords:** *Globularia alypum* L., phenolic compounds, inhibition effect, antioxidant activity, antimicrobial activity.

تقييم النشاطات المضادة للأكسدة، للميكروبات، ومضادات السكري للمستخلصات الفينولية للنبات الطبي في منطقة الأغواط. *Globularia alypum* L.

يندرج هذا العمل في إطار المساهمة في تنمية الثروة النباتية كمصدر لمواد طبيعية نشطة لاكتشاف مركبات ذات قيمة علاجية، ومن هذا المنطلق قمنا بدراسة كيميائية للمركبات الفينولية المستخلصة من نبتة *Globularia alypum* L. وذلك باستخلاصها وتقدير كميتها بالإضافة الى دراسة تأثيراتها البيولوجية حيث قمنا بتقييم خصائصها المضادة للأكسدة، تأثيرها المضاد للميكروبات وتأثيرها على نشاط الإنزيمات من صنف الهيدروليز هما الفاميلاز والفا غليكوزيداز

تراوحت كمية المركبات الفينولية ما بين 1.36 و 14.84 غ / مع مكافئ لحمض الغاليك بينما تراوحت كمية الفلافونيدات بين 0.31 و 4.57 غ/مغ مكافئ الكيرسيتين

بينت نتائج اختبار الخاصية المضادة للأكسدة باستخدام اختبارات DPPH و phosphomolybdate ان هذه المستخلصات تمتلك قدرة كبيرة في مواجهة الجذور الحرة مقارنة بمضادات الاكسدة المرجعية تم تحديد التأثير المضاد للميكروبات للمستخلصات على 5 سلالات بكتيرية و 3 سلالات فطرية بطريقتين مختلفتين (طريقة نشر الأجار، وطريقة الاتصال المباشر) على التوالي، وأظهرت النتائج أن المستخلصين: اسيتات الإيثيل والبيوتانول المتحصل عليهما من الاستخلاص الكحولي المائي ثبطا نمو معظم السلالات المسببة للأمراض التي تم اختبارها. في المقابل، أظهر المستخلص المائي نشاطاً ضعيفاً.

أظهرت جميع المركبات الفينولية المستخلصة تأثيرات مثبطة على كلا الإنزيمين، حيث تراوحت نسب التثبيط بين 8,38% و 61,65% بالنسبة لـ للافاميلاز ومن 12,52% إلى 71,22% بالنسبة للافاغليكوزيداز، اين سجل المستخلص البوتانولي اقوى تثبيط بقيمة  $IC_{50} = 0.22$  مغ/مل

**الكلمات المفتاحية:** *Globularia alypum* L.، المركبات الفينولية، التثبيط، الفعالية المضادة للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات .

## Table des matières

<i>Dédicaces</i> .....	I
<i>Remerciements</i> .....	II
Résumé.....	III
Abstract.....	IV
ملخص.....	V
Table des matières.....	VI
Liste des tableaux.....	XI
Liste des figures.....	XII
Abréviation.....	XIV
Introduction.....	1

### Partie 01 : Aperçu bibliographique

<b>Chapitre 1 : revu bibliographique sur les composés phénoliques</b> .....	5
1. Classification et structure des polyphénols.....	5
1.1. Acides phénoliques et phénols simples.....	6
1.1.1. Acides hydroxybenzoïques.....	6
1.1.2. Acides hydroxycinnamiques.....	7
1.1.3. Phénols simples.....	7
1.2. Flavonoïdes.....	7
1.3. Tanins.....	9
1.3.1. Tannins hydrolysables.....	9
1.3.2. Tanins condensés.....	10
1.4. Lignanes et lignine.....	11
1.5. Coumarines.....	11
1.6. Stilbène.....	12
2. Biosynthèse des composés phénoliques.....	13
3. Biosynthèse des flavonoïdes.....	15
4. Localisation des composés phénoliques.....	17

5. Rôle et intérêt des composés phénoliques .....	17
5.1. Chez les végétaux .....	17
5.2. Chez les humains .....	18
<b>Chapitre 2 : Activités biologiques, généralités et évaluation .....</b>	<b>20</b>
1. Activité antioxydante des composés phénoliques .....	20
1.1. Stress oxydatif.....	20
1.2. Origine du stress oxydatif.....	21
1.3. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène.....	21
1.4. Antioxydants.....	22
1.5. Polyphénols naturels comme antioxydants.....	24
2. L'activité antidiabétique des composés phénoliques .....	30
2.1. Définition du diabète sucré.....	30
2.2. Classification de diabète sucré.....	31
2.2.1 Le diabète de type 1 (anciennement insulino-dépendant DID) .....	31
2.2.2. Le diabète de type 2 (anciennement appelé le diabète non insulino-dépendant DNID) .....	31
2.2.3. Le diabète gestationnel .....	31
2.2.4. Autres types de diabète : le diabète secondaire (spécifique).....	31
2.3. Épidémiologie .....	32
2.4. Complication du diabète .....	32
2.5. Traitements .....	33
2.5.1. Traitements non médicamenteux .....	33
2-5-2- Traitements médicamenteux.....	33
2.6. Traitement du diabète par les produits naturels dérivés de plantes .....	35
2.7. Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase .....	37
2.8. Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase.....	38
2.9. Mécanisme d'action des inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase .....	38
3. L'activité antimicrobienne des composés phénoliques .....	41
3.1. Les infections microbiennes .....	42

3.2. Résistance aux antibiotiques .....	42
3.3. Traitement des infections bactériennes .....	43
3.3.1. Antibiotiques .....	43
3.3.2. Antimicrobiens naturels .....	44
3.4. Relation structure- activité des polyphénols .....	45
<b>Chapitre 3. Présentation de la plante <i>Globularia Alypum L.</i> .....</b>	<b>48</b>
1. Nom vernaculaires .....	48
2. Description botanique.....	48
3. Classification : selon (Quezel et Santa., 1963) .....	49
4. Habitat et répartition géographique .....	49
5. Phytochimie et propriétés biologiques .....	50
6. Travaux antérieurs.....	50
<b>Partie 02 : Matériel et Méthodes</b>	
1. Matériel végétal .....	53
2. Méthodes .....	54
<b>Chapitre 1 : Préparation et quantification des extraits phénoliques .....</b>	<b>56</b>
1. Screening phytochimiques.....	56
2. Préparation des extraits polyphénoliques .....	58
A. Extraction hydro-alcoolique.....	58
B. Extraction aqueuse.....	58
C. Extraction par des solvants à polarité croissante .....	59
3. Calcul de rendement .....	59
4. Dosage et quantification des composées phénoliques .....	59
4.1- Dosage des polyphénols totaux.....	59
4.2. Dosage des flavonoïdes .....	61
<b>Chapitre 2 : Activités biologiques.....</b>	<b>63</b>
1. Evaluation de l'activité antioxydante .....	63
A. Test de DPPH :.....	63

B. Test de phosphomolybdate.....	64
2. Evaluation de l'activité antidiabétique .....	65
2.1. Evaluation de l'activité inhibitrice sur l' $\alpha$ -amylase.....	65
A. Principe de la méthode de dosage par DNS.....	66
B. Test d'inhibition.....	67
C. Etude du pouvoir anti-amylasique.....	68
2.2. Evaluation de l'activité inhibitrice sur L' $\alpha$ – glucosidase.....	69
A. Principe de la méthode.....	70
B. Test d'inhibition.....	71
C. Etude du pouvoir anti- glucosidique.....	72
3. Evaluation de l'activité antimicrobienne .....	72
3.1. Souches microbiennes.....	72
3.2. Revivification des espèces pathogènes .....	73
3.3. Repiquage des souches microbiennes.....	74
3. 4. Préparation de l'inoculum .....	74
3.5. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	75
3. 6. Détermination de l'activité antifongique.....	75
Analyse statistique .....	76

### **Partie 03 : Résultats et discussions**

1. Tests phytochimiques.....	78
2. Rendement des extraits.....	79
3. Dosage et quantification des composées phénoliques.....	81
3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	81
3.2. Dosage des flavonoïdes .....	85
4. Activités biologiques.....	88
4.1. Évaluation de l'activité antioxydante .....	88
4.1. 1. Résultats du pouvoir antioxydant du radical libre DPPH.....	88
4.1.2. Résultats du pouvoir antioxydant par le test du phosphomolybdate.....	93

4. 2. Évaluation de l'activité antidiabétique .....	97
4. 2. 1. Test d'inhibition .....	98
4. 2. 2. Étude des pouvoirs anti-amylasiques et anti- glucosidiques de <i>Globularia alypum</i> L .....	100
4.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne .....	103
4.3.1. Évaluation de l'activité antibactérienne.....	103
4.3.2. Évaluation de l'activité antifongique.....	105
Conclusion et perspectives .....	111
Références Bibliographiques .....	114
<b>Annexes</b> .....	132

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> . Les composés antioxydants majeurs des cellules (Benabed., 2018).....	23
<b>Tableau 2</b> . Les tests les plus utilisés pour évaluer l'activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	29
<b>Tableau 3</b> . Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne (Daglia., 2012) .....	46
<b>Tableau 4</b> . Travaux antérieurs consacrés à l'étude de la plante <i>Globularia alypum</i> L. ....	51
<b>Tableau 5</b> . Les données géographiques de la région de collecte .....	53
<b>Tableau 6</b> . Souches microbiennes utilisées lors des tests microbiologiques .....	73
<b>Tableau 7</b> . Résultats des tests phytochimiques de la partie aérienne de l'espèce <i>Globularia alypum</i> L.....	78
<b>Tableau 8</b> . Teneur, aspect et couleur des extraits organiques de la plante <i>Globularia alypum</i> L...79	
<b>Tableau 9</b> . Teneur en polyphénols totaux des extraits de la plante <i>Globularia alypum</i> L. ....	82
<b>Tableau 10</b> . Teneurs en flavonoïdes des extraits obtenus de la plante <i>Globularia alypum</i> L. ....	85
<b>Tableau 11</b> . Les valeurs d'EC <sub>50</sub> (µg /ml) des différents extraits de la plante <i>Globularia alypum</i> L. et des antioxydants standards .....	89
<b>Tableau 12</b> . Les VCEAC des différents extraits obtenus par le test phosphomolybdate .....	94
<b>Tableau 13</b> : Taux d'inhibition des extraits phénoliques de la plante <i>Globularia alypum</i> L. vis - à vis de l'α - amylase et de l'α – glucosidase.....	98
<b>Tableau 14</b> . Taux d'inhibition des extraits phénoliques de <i>Globularia alypum</i> L. vis-à-vis de l'α- amylase et l'α-glucosidase .....	101
<b>Tableau 15</b> . Diamètre (mm) des zones d'inhibition des extraits de <i>Globularia alypum</i> L. contre les souches bactériennes .....	103
<b>Tableau 16</b> . Pourcentage d'inhibition des extraits phénoliques de <i>Globularia alypum</i> L. relatif aux souches pathogènes fongiques .....	106

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Les principales classes de composés phénoliques (Boros <i>et al.</i> , 2010).....	6
<b>Figure 2 .</b> Structures chimiques des acides phénoliques .....	7
<b>Figure 3 .</b> Les principaux aglycones des flavonoïdes.....	9
<b>Figure 4 .</b> Exemple tannins hydrolysables. Geraniine.....	10
<b>Figure 5 .</b> Exemple tannins condensés. Proanthocyanidine.....	10
<b>Figure 6.</b> Structure de base des lignanes (a) : phénylpropane (b) : lignane .....	11
<b>Figure 7 .</b> Exemple de quelques lignanes .....	11
<b>Figure 8.</b> Structure des coumarines.....	12
<b>Figure 9 .</b> Structure des stilbènes .....	12
<b>Figure 10 .</b> Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols .....	14
<b>Figure 11 .</b> Voies de biosynthèse des flavonoïde.....	16
<b>Figure 12 .</b> Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique .....	19
<b>Figure 13 .</b> Stress oxydant .....	20
<b>Figure 14 .</b> Sources endogènes des espèces réactives d'oxygène (Rezaire., 2012).....	22
<b>Figure 15 .</b> Mécanismes d'action antioxydante des composés phénoliques (Leopoldini <i>et al.</i> , 2011) .....	25
<b>Figure 16 .</b> Les flavonoïdes et leurs sites de chélation des ions métalliques (Mn+) .....	27
<b>Figure 17.</b> Les principales étapes de la digestion des sucres (d'après Allanic, 1997).....	39
<b>Figure 18 .</b> Mécanisme d'action des inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase. (Karam., 2007) .....	40
<b>Figure 19 .</b> <i>Globularia alypum</i> L. (originale, prise le 08 avril 2016 à Oued Morra, Laghouat) .....	48
<b>Figure 20 .</b> La classification de l'espèce <i>Globularia alypum</i> L. ....	49
<b>Figure 21 .</b> Répartition mondiale de la plante <i>Globularia alypum</i> L. ....	50
<b>Figure 22 .</b> Carte géographique représentant les régions de récoltes. (Google maps) .....	53
<b>Figure 23 .</b> Plan général de la partie expérimentale .....	55
<b>Figure 24 .</b> Structure de l'acide gallique .....	60
<b>Figure 25 .</b> Structure de quercétine .....	61

<b>Figure 26</b> . Structure chimique du radical DPPH' et de sa forme réduite .....	63
<b>Figure 27</b> . Produits de dégradation de l'amidon par l' $\alpha$ – amylase.....	66
<b>Figure 28</b> . Produits de dégradation du saccharose par l' $\alpha$ – glucosidase .....	70
<b>Figure 29</b> . La réaction du réactif DNS avec un sucre réducteur .....	70
<b>Figure 30</b> . Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux .....	82
<b>Figure 31</b> . Courbe d'étalonnage de quercétrine .....	85
<b>Figure 32</b> . Corrélation entre les phénols totaux et les flavonoïdes des extraits de <i>Globularia alypum</i> L.....	87
<b>Figure 33</b> . Histogramme représentant le classement décroissant des extraits phénoliques de la plante <i>Globularia alypum</i> L. selon leurs EC <sub>50</sub> .....	90
<b>Figure 34</b> . Histogrammes représentant une comparaison entre le taux en phénols totaux et l'activité antioxydante (DPPH) de chaque extrait de l'espèce <i>Globularia alypum</i> L. ....	92
<b>Figure 35</b> . Histogramme représentant le classement décroissant des extraits phénoliques de la plante <i>Globularia alypum</i> L. selon leurs VCEAC .....	95
<b>Figure 36</b> . Histogrammes représentant une comparaison entre le taux en phénols totaux et l'activité antioxydante (phosphomolybdate) de chaque extrait de l'espèce <i>Globularia alypum</i> L...	96
<b>Figure 37</b> . Pourcentages d'inhibition des extraits phénoliques de <i>Globularia alypum</i> L. vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase .....	99
<b>Figure 38</b> . Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de la souche fongique <i>Aspergillus flavus</i> par les extraits de <i>Globularia alypum</i> L.....	107
<b>Figure 39</b> . Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de la souche fongique <i>Penicillium spp</i> par les extraits de <i>Globularia alypum</i> L.....	107
<b>Figure 40</b> . Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de la souche fongique <i>Fusarium oxysporum</i> par les extraits de <i>Globularia alypum</i> L. ....	108

## Abréviation

<b>AlCl<sub>3</sub></b>	: Trichlorure d'aluminium
<b>DMSO</b>	: Diméthyl sulfoxyde.
<b>DNS</b>	: Acide 3,5-dinitrosalicylique
<b>DPPH</b>	: 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
<b>EC<sub>50</sub></b>	: Efficience concentration
<b>ERO</b>	: Espèce réactive d'oxygène (Reactive Oxygen Species)
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	: Tri chlorure de fer
<b>FID</b>	: Fédération Internationale du diabète
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Concentration inhibitrice à 50%
<b>Mo</b>	: Molybdate
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	: Carbonate de Sodium
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé
<b>PPM</b>	: Phosphomolybdate
<b>ROOH</b>	: Peroxydes organiques
<b>ROO.</b>	: Radical peroxyde
<b>VCEAC</b>	: <b>V</b> itamin <b>C</b> <b>E</b> quivalent <b>A</b> ntioxydant <b>C</b> apacity

# **Introduction**

## Introduction

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours constitué une source importante d'agents thérapeutiques. L'Homme a été confronté à la maladie et a cherché à la soigner avec les moyens disponibles dans son environnement. C'est aussi la plus moderne car, depuis quelques décennies, la recherche médicale et pharmaceutique a prouvé, de manière rationnelle et scientifique, que les propriétés thérapeutiques de ces plantes sont assurées par une large gamme de composés qui font partie de leurs métabolites secondaires (**Jensen R., 2002**).

En effet, l'investigation des plantes représente un potentiel intéressant pour la découverte de nouvelles substances à effet thérapeutique contre plusieurs pathologies, si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires. (**khaldi et al., 2012**).

L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (**Small et Catling., 2000**). Actuellement, environ 25-30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) ou sont des dérivés de produits naturels. (**Nabavi et al., 2015**).

Les composés phénoliques phytochimiques sont un des métabolites secondaires synthétisés par les plantes pour se protéger des contraintes biologiques et environnementaux. Ces composés constituent une partie importante de l'alimentation humaine et animale, ils possèdent également des activités pharmacologiques remarquables prouvées par de nombreuses études récentes (**Ozcan et al., 2014**). Ils sont considérés en thérapeutique comme des agents préventifs de plusieurs maladies, parmi lesquelles celles associées au stress oxydatif, tel que le cancer et les maladies cardio-vasculaires (**Ma et al., 2010**). A leurs propriétés biologiques s'ajoute également leur capacité à inhiber l'activité d'un grand nombre important d'enzymes digestives comme l' $\alpha$ -amylase, l' $\alpha$ -glucosidase, la pepsine, la trypsine et les lipases, notamment par les flavonoïdes et leurs dérivés sucrés, et le sujet a été largement étudié (**Chethan et al., 2008**).

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité floristique : méditerranéenne, saharienne et une flore paléo tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques (**Ozenda., 1991**). Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques (**Chehma et Djebbar., 2008**). Ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle Algérienne une richesse inestimable.

La présente étude, est consacrée à la valorisation phytochimique d'une plante spontanée locale à savoir *Globularia alypum* L. connue localement sous le nom de «Tasselgha», qui consiste à étudier ses extraits phénoliques. Le choix de cette plante est basé sur le fait que cette dernière est surtout reconnues en thérapeutique traditionnelle pour ses propriétés remarquables (traitement d' l'hypoglycémie, des maladies rhumatismales, gastriques et infectieuses, des maladies rénales et cardiovasculaires, de la goutte, de la fièvre typhoïde et intermittente) (**Taghzouti et al., 2016**). Ces informations ont été obtenues par des entrevues ethnobotaniques avec des personnes nées et/ou ayant vécu longtemps dans les régions de Laghouat.

Dans ce contexte, l'objectif global de ce travail vise à démontrer la richesse de notre plante en polyphénols et à déterminer leur propriété biologique. Pour cela cette étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique base principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques. Le second aspect est consacré à l'évaluation *in vitro* les activités biologiques de *Globularia alypum* L. en particulier la capacité antioxydante, antimicrobienne et antidiabétique des extraits phénoliques présents.

La première partie de l'étude renferme une synthèse bibliographique qui inclut trois chapitres, dont l'étude des composés phénoliques fait l'objet du premier chapitre. Le deuxième chapitre est consacré aux activités biologiques, dans le troisième chapitre, nous rappelons la description (caractères botaniques et systématique) de la plante étudiée, la répartition géographique et quelques utilisations dans la pharmacopée traditionnelle.

La partie expérimentale constitue la deuxième partie du manuscrit et consiste en une présentation détaillée du matériel et des méthodes expérimentales utilisés dans cette étude (la collecte des échantillons, leur séchage, leur broyage, les méthodes d'extraction). Nous avons aussi, mis le point sur tous les protocoles adoptés pour le dosage des polyphénols, ainsi que l'évaluation des activités biologique des extraits préparés.

Par ailleurs, la troisième et dernière partie a été consacrée à la mise en exergue et à la discussion de tous les résultats obtenus, en comparaison avec les études antérieures pour les mettre en évidence.

Enfin, nous achèverons ce travail par une conclusion générale dans laquelle différentes perspectives de recherche seront évoquées, sur la base des résultats obtenus.

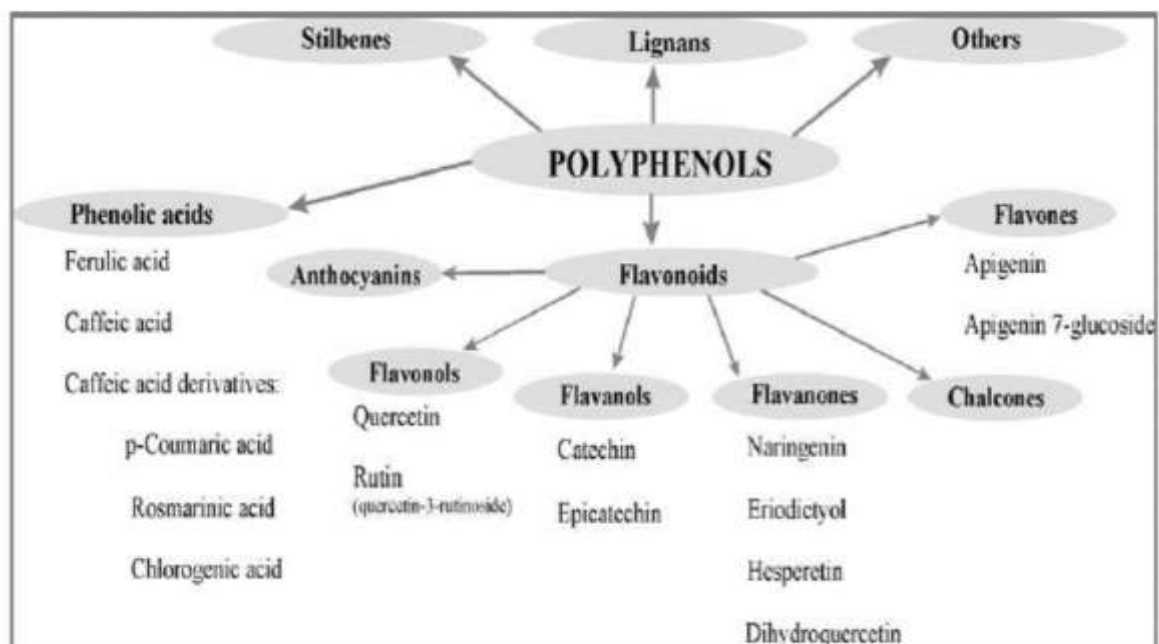
*Partie : Aperçu  
bibliographique*

## Chapitre 1 : revue bibliographique sur les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes comme les fruits, les légumes et les produits naturels végétaux. Ce sont des dérivés non azotés possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupes hydroxyles ( $\text{—OH}$ ) libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, ester, hétéroside, etc.) (**Bennetau-Pelissero., 2014**). Plus de 8000 structures ont été identifiées, allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins. La qualité et la quantité des polyphénols dans les plantes peuvent varier considérablement en fonction de différents facteurs intrinsèques et extrinsèques tels que le génotype de la plante, la composition du sol, le degré de maturité et l'état de la culture) (**Faller et Fialho., 2010**).

### 1. Classification et structure des polyphénols

Structuralement, les composés phénoliques ont une structure chimique identique : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Ceux-ci permettent aux composés phénoliques simples de se polymériser en phénols complexes ou polymérisés. Ils peuvent être regroupés en plusieurs catégories qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base, puis par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation etc.) et enfin par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides généralement) (**Bragazza et Freeman., 2007**). On distingue : les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques), les flavonoïdes, les tanins et les lignines et plus rarement, les coumarines et les stilbènes. Les différentes classes de ces composés sont représentées dans la **Figure 1**.



**Figure 1.** Les principales classes de composés phénoliques (Boros *et al.*, 2010)

### 1.1. Acides phénoliques et phénols simples

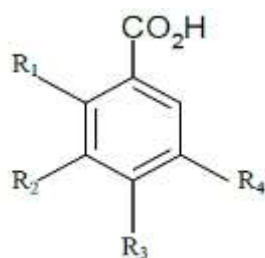
Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Cette classe contient des formes les plus simples des composés phénoliques, Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique.

#### 1.1.1. Acides hydroxybenzoïques

Ce sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Ils sont particulièrement représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline ou enzymatique. Ils sont souvent présents sous formes d'esters ou de glycosides (Macheix., 2005). Ces acides sont caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyl lié au phénol. Les principaux acides hydroxybenzoïques dont les plus répandus sont l'acide cinnamique, l'acide salicylique, l'acide gallique et l'acide vanillique, base de médicaments connus (Figure 2).

### 1.1.2. Acides hydroxycinnamiques

Dérivés de l'acide cinnamique, ils ont une structure avec un cycle aromatique associé à trois carbones C6- C3, souvent estérifiés, parmi les acides connus, citons à titre d'exemples : l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide ferulique (**Figure 2**).



Acides hydroxybenzoïques

R1=R4=H, R2=OCH3, R3=OH Acide vanillique

R1= H, R2=R3=R4 =OH Acide gallique

R1=OH, R2=R3=R4=H Acide salicylique



Acides hydroxycinnamiques

R1=R3=H, R2=OH Acide p-coumarique

R1= R2=OH, R3 =H Acide caféique

R1=OCH3, R2=OH, R3=H Acide férulique

**Figure 2 .** Structures chimiques des acides phénoliques

### 1.1.3. Phénols simples

Les phénols simples sont des molécules aromatiques avec un groupe hydroxyle OH lié au carbone benzénique. Tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les phénols les plus simples sont des structures en C6 constituées d'un cycle aromatique avec des groupes hydroxyles attachés, comme les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, qui ont été montré pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes (**Cowan., 1999**).

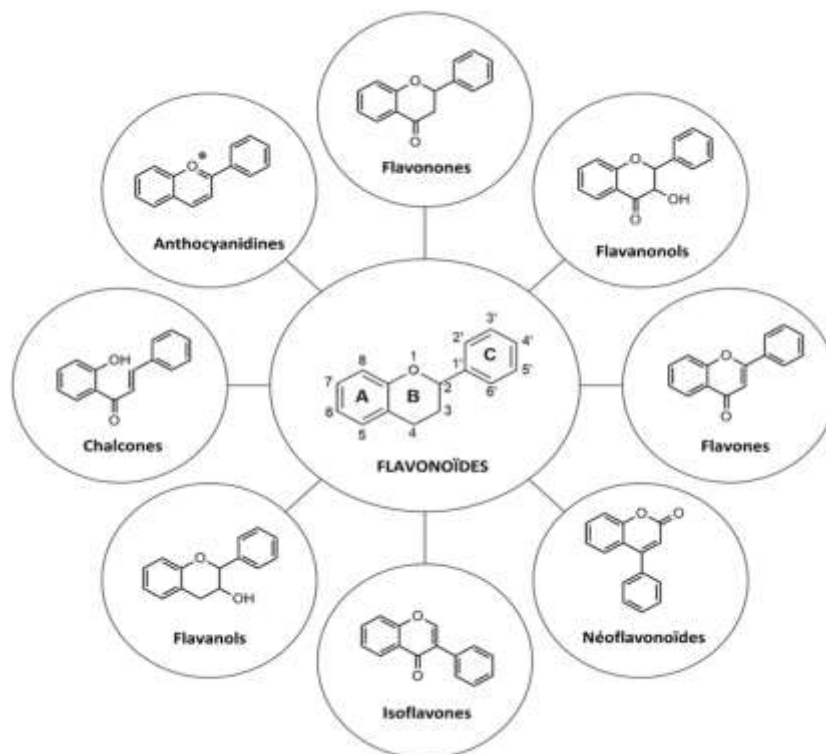
## 1.2. Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. avec plus de 8000 composés différents et distribués de manière générale, dans les différents tissus des plantes vasculaires comme les fleurs, les fruits, les racines, les tiges et les feuilles où ils jouent un rôle très important comme pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (**Ghedira., 2005**). À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides. Ces composés ont une structure de base

possède 15 atomes de carbones, constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par une chaîne en C3 qui est habituellement un hétérocycle oxygéné (cycle C). (Sarma., 2011) Elles diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, et la nature de C.

Selon le nombre, la position et la nature des substituants des deux cycles aromatiques et le degré d'oxydation et de substitution du noyau pyranique central, on distingue six sous-groupes de flavonoïdes (**Figure 3**) :

- ❖ Les flavonols sont des 3-hydroxyflavones. Ce sont des pigments végétaux que l'on trouve souvent sous forme de glycosides ; (par exemple. kaempférol, quercétine), qui sont abondants dans les oignons, les poireaux et le brocoli.
- ❖ les flavones sont des 2-phénylchromones, incolores (par exemple, l'apigénine, la lutéoline), que l'on trouve dans le persil et le céleri.
- ❖ les isoflavones sont des 3-phénylchromones, beaucoup moins répandues que les flavones (par exemple, la daidzéine, la génistéine), majoritaires dans les produits issus du soja.
- ❖ les flavanones sont des 2,3-dihydroflavones (par exemple, l'hespérétine, la naringénine), qui sont particulièrement abondantes dans les agrumes et les tomates.
- ❖ les flavanols sont également des produits de réduction, au moins formellement, des flavonols (par exemple, (+)-catéchine, (—)-épicatéchin, épigallocatechine, épigallocatechine gallate (EGCG), que l'on trouve dans le thé vert, le vin rouge, le chocolat.
- ❖ les anthocyanes sont des dérivés réduits de flavonols avec formation d'oxonium (par exemple, pélargonidine, cyanidine, malvidine), dont les sources incluent le vin rouge et les baies.



**Figure 3 .** Les principaux aglycones des flavonoïdes

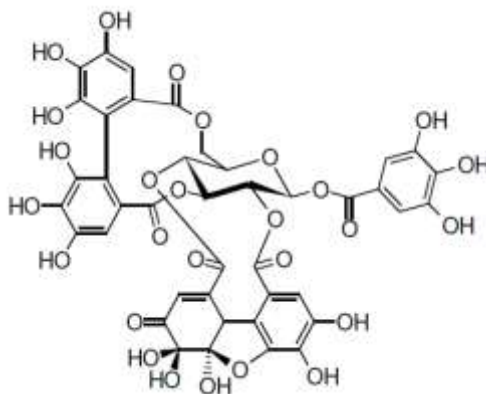
### 1.3. Tanins

Les tanins sont des polyphénols à haut poids moléculaire (500-5000). Leur saveur astringent mais ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner et de précipiter avec les protéines, ce qui explique leur tannant. Les tanins sont répandus dans le règne végétal mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les fagacées et les rosacées. L'accumulation de ces molécules dans le végétal s'effectue essentiellement dans toutes les parties de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines. Selon leurs structures biochimiques, on distingue deux grands groupes ; les tanins condensés et les tanins hydrolysables (**Catier et Roux., 2007**).

#### 1.3.1. Tannins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acides phénols, ou de dérivés d'acides phénols. La molécule glucidique est généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins. (**Bouchouka ., 2016**). Ce groupe de tanins

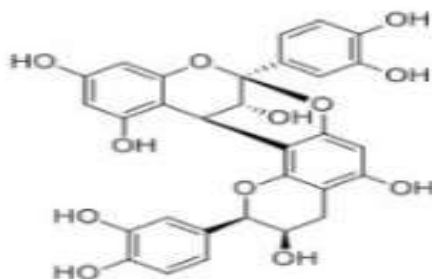
est facilement hydrolysés par voie chimique ou enzymatique retrouvés uniquement chez les dicotylédones (**Figure 4**).



**Figure 4** . Exemple tannins hydrolysables. Geraniine

### 1.3.2. Tanins condensés

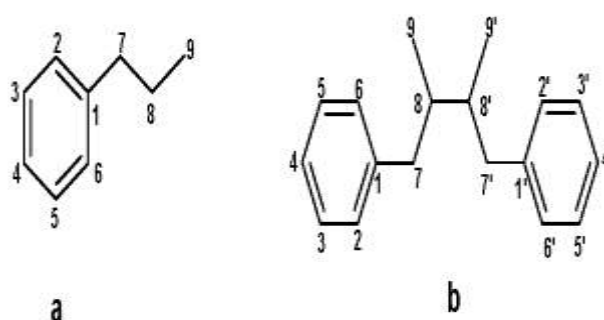
Les tanins condensés sont des polyphénols de masse molaire élevée (**Figure 5**), appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines sont largement répandus dans l'alimentation humaine. Ils diffèrent fondamentalement des tannins hydrolysables car ils n'ont pas de sucre dans leur molécule et leur structure de base constitué d'unité de flavan-3-ols ou le flavan-3,4-diol liées entre elles par des liaisons carbone- carbone (**Bruneton., 1999**) On les trouve assez souvent chez les plantes vasculaires telles que les dicotylédones, les gymnospermes et les fougères (**Ghnimi ., 2015**).



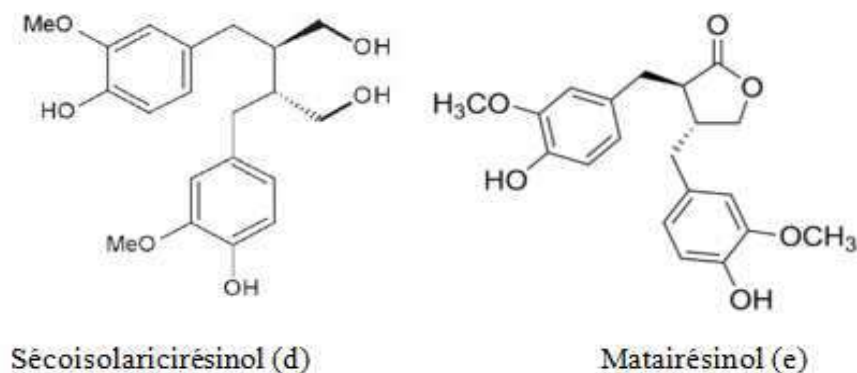
**Figure 5** . Exemple tannins condensés. Proanthocyanidine

### 1.4. Lignanes et lignine

Les lignanes constituent une classe importante de substances naturelles dans le règne végétale. Ces composés contribuent à former avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques la paroi des cellules végétales. Ils jouent un rôle important dans le soutien structurel des plantes. Il s'agit du deuxième polymère le plus abondant dans la nature, après la cellulose. Ce sont des dimères ramifiés de phénylpropènes (C6-C3), qui sont formés par la condensation de trois types d'alcools : l'alcool p-coumarique, l'alcool coniférique et l'alcool sinapique. (Nkhili., 2009). La polymérisation de ces trois alcools conduit à la formation de la lignine (**Figure 6**).



**Figure 6.** Structure de base des lignanes (a) : phénylpropane (b) : lignane

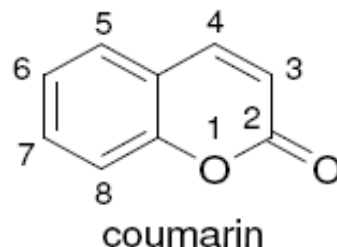


**Figure 7 .** Exemple de quelques lignanes

### 1.5. Coumarines

Les coumarines sont des dérivés de C6-C3, caractérisées par une structure qui comporte un noyau benzo- $\alpha$ -pyrone et fréquemment sont hydroxylées en position (**Figure 8**). On les retrouve dans la nature soit à l'état libre, soit combinés à des sucres. Ces composés constituent une classe importante de produits naturels et dégagent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. Les familles les plus riches en

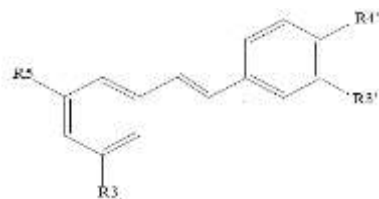
coumarines sont : les légumineuses, les rutacées, les apiécées et les thymeleacées. Elles sont présentes dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les graines. (Cowan., 1999).



**Figure 8.** Structure des coumarines.

### 1.6. Stilbène

Ces dérivés hydroxylés sont des composés phénoliques dérivés de l'acide hydroxycinnamique dont le squelette de base est constitué de deux noyaux aromatiques liés par un groupe éthylénique C6-C2-C6. Ce sont des phytoalexines, composés diversifié de phénols de défense naturels, produits par les plantes et abondants dans les raisins, les baies et les déchets d'écorce de conifère, le soja et les arachides. Le resvératrol l'un des stilbenes les plus connus se trouve dans le raisin et le vin (Cornwell *et al.*, 2004).



R3=R5=R4'=OH, R3'=H Trans resvératrol

R3=R5, R3'=H Pinosylvine

R3=R5=R3'=R4'=OH Picéatannol

**Figure 9 .** Structure des stilbènes

## 2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside. Le ou les noyaux aromatiques peuvent être synthétisés soit par la voie du **shikimates**, soit par celle de **l'acétate/malonate**, ce qui permet de différencier deux classes de composés phénoliques. Par ailleurs, la diversité structurelle des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (**Martin et Andriantsitohaina., 2002**).

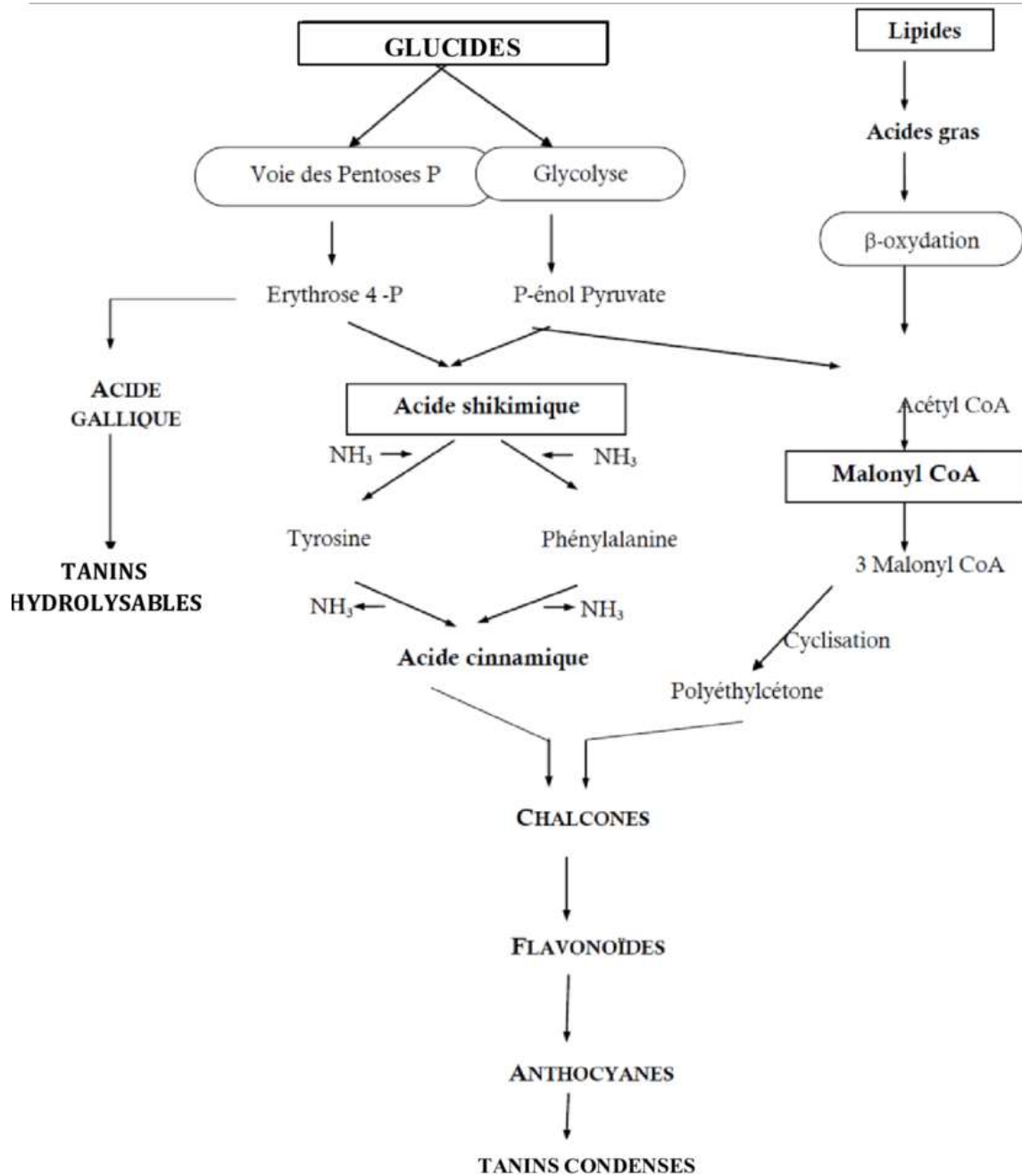
### ➤ Voie de l'acide shikimique

C'est est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes, y compris les deux acides aminés aromatiques : phénylalanine et tyrosine sont à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux, ces deux acides aminés sont formés par la voie de shikimate du métabolisme primaire.

Elle conduit après désamination de la phénylalanine, à la formation du précurseur immédiat des phénols (l'acide *t*-cinnamique, acide *p*-coumarique) grâce à l'action de la Phénylalanine Ammoniac Lyase (PAL). La séquence biosynthétique qui suit, dénommée voie phénylpropanoïde, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques qui conduisent à la synthèse de différents composés phénoliques (**Figure 10**).

### ➤ Voie de l'acétate / malonate

La glycolyse et la  $\beta$ -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est par cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée des unités « Acétate » par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Akroum, 2011**).



**Figure 10 .** Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols

### 3. Biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse de ces molécules flavonoïques s'effectue par un précurseur commun connu : 4,2',4',6'- Tétrahydroxychalcone à partir de laquelle se différencient plusieurs types des flavonoïdes (**Bruneton., 1999**).

L'élaboration de ces composés phénoliques réside dans la condensation de trois unités de malonyl-CoA pour le cycle A qui dérive de la voie acétate malonate avec une molécule de p-coumaryl pour le cycle B qui dérive de la voie shikimate et aussi pour l'hétérocycle C.

Ces condensations sont catalysées par la chalcone synthase (CHS), une enzyme clé dans la formation des flavonoïdes qui conduit à un précurseur, une chalcone (**Figure 11**). Cette chalcone est métabolisée sous l'action de l'enzyme chalcone isomérase, en flavanone naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la flavanone-3-hydroxylase (FHT) pour donner la formation de la flavone : apigénine ou le dihydroflavonol qui est ensuite transformé en flavonol par la flavonolsynthase (FLS).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyle, méthoxyle et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire. (**Touafek., 2010**).

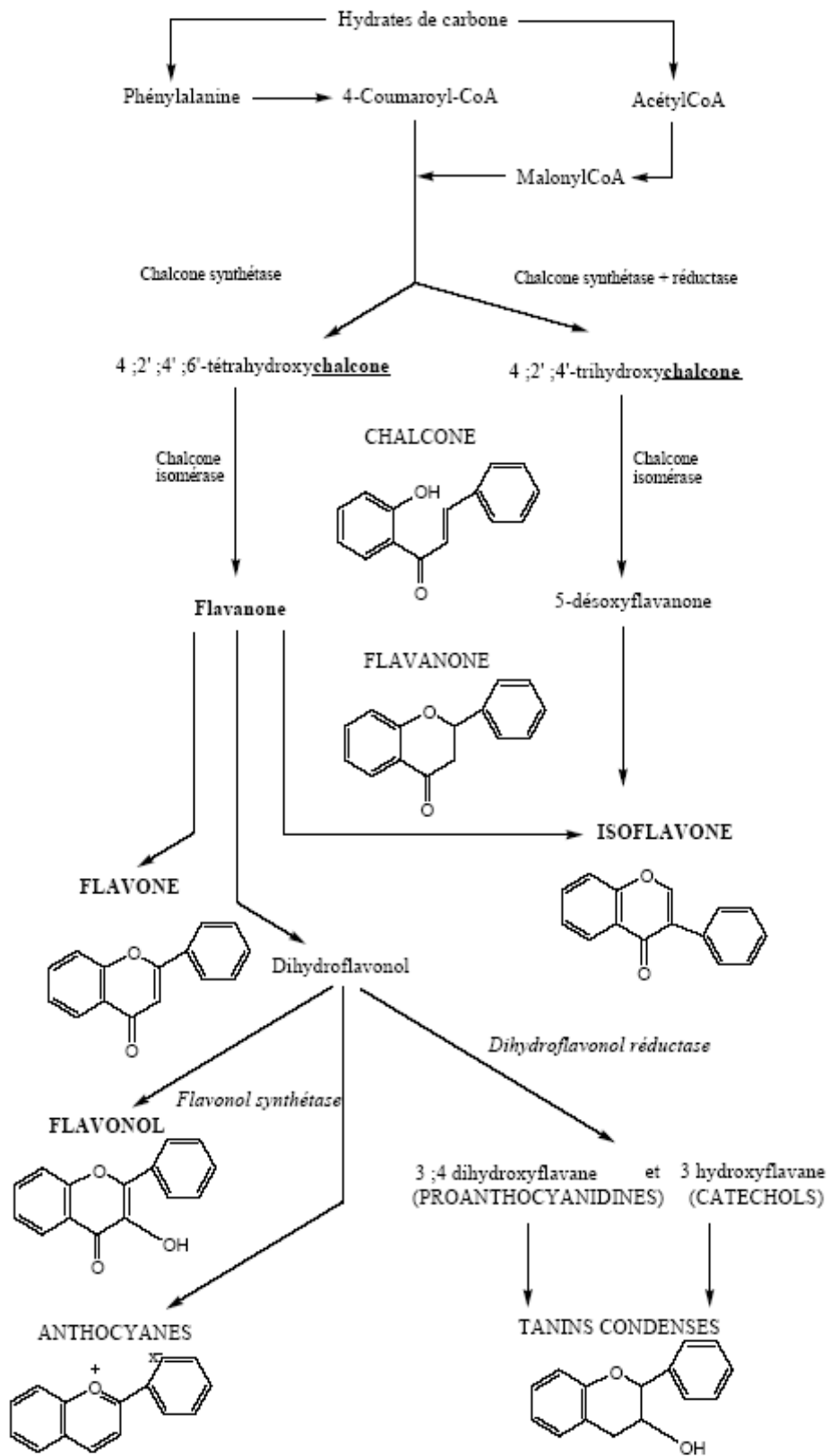


Figure 11 . Voies de biosynthèse des flavonoïdes (Winkel-Shirley., 2002)

#### 4. Localisation des composés phénoliques

Les polyphénols sont présents dans tous les organes végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, écorces, pollens, fruits, graines et bois). Leur accumulation dans les plantes, varie non seulement dans les différentes parties de la plante, mais aussi d'une espèce végétale à l'autre. Avec une répartition quantitative hétérogène qui varie entre les différents organes et tissus. **(Saffidine., 2015)**. Ils sont synthétisés dans le cytosol. Certaines des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes sont liées aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons **(Bénard., 2009)**.

Au niveau cellulaire, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui augmente leur solubilité et limite leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales.

Par ailleurs, la localisation de ces composés au niveau tissulaire est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein des feuilles, la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont principalement présents dans l'épiderme. **(Boubekri., 2014)**.

#### 5. Rôle et intérêt des composés phénoliques

##### 5.1. Chez les végétaux

Les polyphénols constituent un groupe important de substances naturelles largement répandues et synthétisées par l'ensemble des végétaux. Ces molécules jouent un rôle majeur dans la croissance des végétaux et participent aux réactions de défense contre divers stress biotiques (pathogènes tels que moisissures, champignons et bactéries, blessures, symbioses) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Ils contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) et à la formation de polymères structuraux comme la lignine constituant la rigidité du bois. Certains d'entre eux sont des répulsifs qui inhibent la croissance d'autres espèces. **(Ghnimi., 2015)**.

## 5.2. Chez les humains

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies par leurs effets bénéfiques sur la santé. De nombreuses études épidémiologiques ont montré l'effet protecteur des polyphénols dans les fruits et légumes contre les maladies dégénératives en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes (**Fettah., 2019**). En outre, des études ont montré que les composés phénoliques ont des activités antivirales, anti-inflammatoires, anti-tumorales et ont un rôle bénéfique dans la prévention des cancers et des maladies cardiovasculaires. Ces composés sont réputés aussi pour leur capacité de moduler l'activité d'un grand nombre d'enzymes et de certains récepteurs cellulaires (**Shi et al., 2003**).

## 6. Propriétés physico-chimiques des composés phénoliques

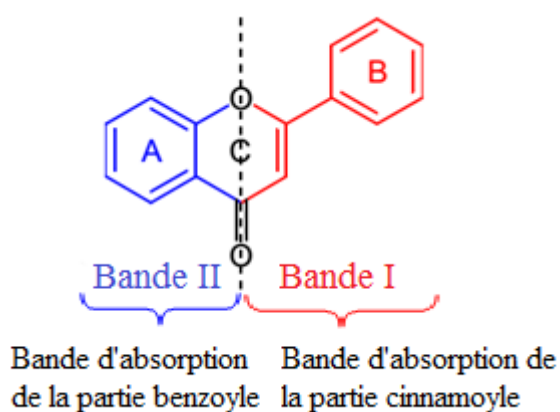
Bien qu'ils constituent un groupe de composés aux structures largement diversifiées, et comme tous les dérivés hydroxylés, les phénols sont des molécules associées par des liaisons hydrogène, et donc peu volatiles. Ils sont généralement des principes solubles dans les solvants organiques polaires, tel que l'éthanol et le méthanol, à l'exception de certains flavonoïdes lipophiles. Ce sont des substances peu stables, facilement oxydables, sensibles aux températures élevées et aux pH excessifs, et qui ont tendance à s'isomériser sous l'influence des rayons ultraviolets (**Bruneton., 1999**).

La lumière, le pH, la température, la nature du solvant, la présence d'enzyme, d'ions métalliques et d'oxydants ont été décrits comme des paramètres influençant la stabilité des polyphénols (**Anthoni., 2007**).

La capacité des composés phénoliques à former des complexes avec les métaux est utile dans la nature, mais aussi dans le domaine de la recherche scientifique. La solubilité des flavonoïdes dans l'eau et dans des solvants très apolaires est faible et dépend du pH. La couleur des flavonoïdes se change de bleu au rouge, au violet, et parfois au jaune, ces variations sont le résultat soit d'un changement de pH du milieu, soit de la complexité de ces molécules à des métaux comme le Fer et l'Aluminium. Cette propriété a permis de changer le spectre d'absorption de ces composés, elle a été alors exploitée pour identifier la teneur des plantes en flavonoïdes. (**Vermerris et Nicholson., 2006**).

L'identification des flavonoïdes grâce aux spectres UV permet d'observer deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm. La bande I (300-395 nm) due à l'absorption de la partie cinnamoyle (noyau B) du flavonoïde et la bande II (240-280 nm) qui est associée à l'absorption de la partie benzoyle (**Harborne et Williams., 2000**). (**Figure 12**).

Les acides phénoliques sont généralement caractérisés par des maximums d'absorption entre 254 et 320 nm. Par exemple, l'acide vanillique peut être détecté à 254 nm, l'acide gallique et syringique à 275 nm, l'acide salicylique à 305 nm tandis que les acides chlorogénique, caféique, gentsique, sinapique, p-coumarique, férulique et rosmarinique sont caractérisés par une absorption maximale à 320 nm (**Garcia-Perez ., 2008**).



**Figure 12** . Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

## Chapitre 2 : Activités biologiques, généralités et évaluation

### 1. Activité antioxydante des composés phénoliques

Les composés phénoliques possèdent des activités biologiques importantes qui peuvent être liées à leurs structures chimiques. Cependant les progrès scientifiques nous ont permis de comprendre certaines relations entre la structure et l'activité biologique de ces substances. La diversité structurelle des composés phénoliques, surtout celle des flavonoïdes, leur a conféré plusieurs types d'interactions vis-à-vis d'autres molécules biologiques : eau, protéines et lipides, et donc plusieurs activités biologiques intéressantes. L'une des raisons primordiales est la reconnaissance de leur propriété antioxydante, ainsi qu'à leur implication dans la prévention de diverses pathologies associées au stress oxydatif (Akagawa et Suyama., 2001). Ils ont une valeur commerciale très importante surtout dans le domaine agroalimentaire et pharmaceutique en tant que puissants antioxydants naturels particulièrement les flavonoïdes qui sont des piègeurs efficaces de radicaux libres les plus prooxydants (Macheix *et al.*, 2005).

#### 1.1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est communément défini comme un déséquilibre entre la présence d'espèces réactives de l'oxygène et de nitrogène (EOR et ERN) (Caractère pro-oxydant) et la capacité du corps à les neutraliser, à réparer les dommages oxydatifs (Figure 13) (système antioxydant) et à réguler leur production dans une cellule ou un compartiment cellulaire. Ce déséquilibre peut endommager certaines macromolécules (acides nucléiques, lipides et protéines), conduisant à l'apparition des diverses maladies (Smaga *et al.*, 2015).

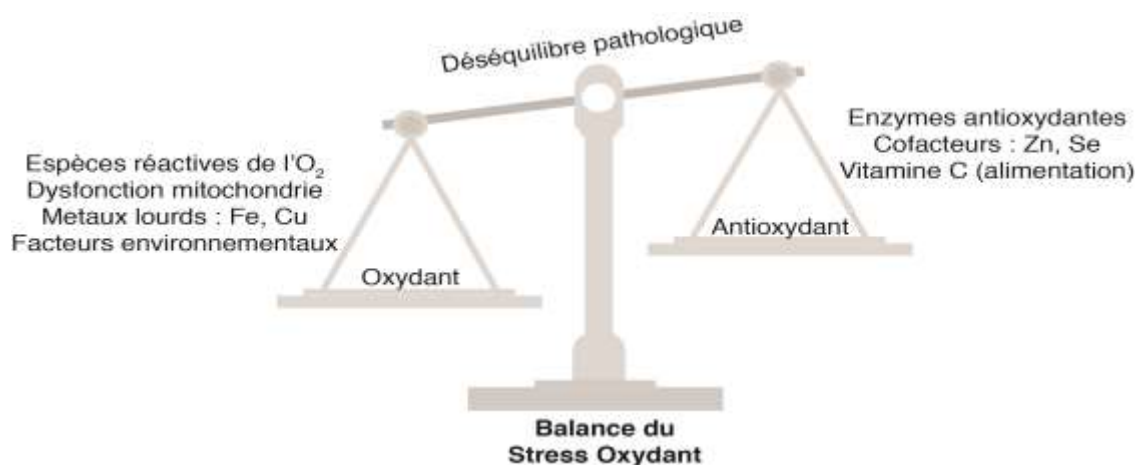


Figure 13 . Stress oxydatif

## 1.2. Origine du stress oxydatif

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles à l'organisme à des doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par les systèmes de défense. Dans des circonstances normales, on dit que la balance antioxydantes/ prooxydants est équilibrée. Si ce n'est pas le cas, soit à cause d'un déficit en antioxydants, soit à cause d'une surproduction de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé Stress oxydatif. Il est maintenant admis que le phénomène de stress oxydant est impliqué dans l'étiologie de nombreuses maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington), de désordres pathologiques, mais également dans les phénomènes de vieillissement (Favier., 2003).

## 1.3. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant un nombre impair d'électrons sur sa couche périphérique. Ces molécules sont caractérisées par leur instabilité et leur réaction rapide avec d'autres composants, afin de capturer l'électron nécessaire pour acquérir leur stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical attaque la molécule stable la plus proche, en lui arrachant son électron ; la molécule attaquée devient alors elle-même une molécule instable (Bayir, 2005). Espèces réactives de l'oxygène ERO, une classe spécifique de radicaux, incluant des radicaux libres comme le radical hydroxyl ( $\text{OH}\cdot$ ), le radical superoxyde ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), et sa forme protonée ( $\text{HO}_2\cdot$ ), le radical peroxy ( $\text{ROO}\cdot$ ) ainsi que des espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) l'acide hypochloreux ( $\text{HOCl}$ ) et l'ozone ( $\text{O}_3$ ), qui peuvent être facilement transformés en radicaux (Gupta., 2010).

Par ailleurs, L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme (sources exogènes) tel que l'exposition aux rayons UV, le tabagisme, les radiations ionisantes, les champs électriques, les polluants industriels et les pesticides, ainsi qu'une alimentation malsaine (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres (Mena *et al.*, 2009).

Cependant, les ERO sont produits continuellement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule eucaryote par divers mécanismes physiologiques à des doses raisonnables au cours du métabolisme normal (Figure 14). La production endogène est plus importante que celle d'origine exogène. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par les

systèmes de défense et est impliquée dans le bon déroulement de la réaction immunitaire, de la phagocytose et de la communication cellulaire. Les réactions enzymatiques, le transport mitochondrial des électrons, la transduction des signaux, l'activation des facteurs de transcription nucléaires, l'expression des gènes et l'action antimicrobienne des neutrophiles et des macrophages (Bayir., 2005).

En raison de l'implication des radicaux libres dans diverses pathologies, la recherche de nouvelles molécules pouvant compenser un déficit du système de protection naturelle antiradicalaire est largement intensifiée (Novelli., 1997).

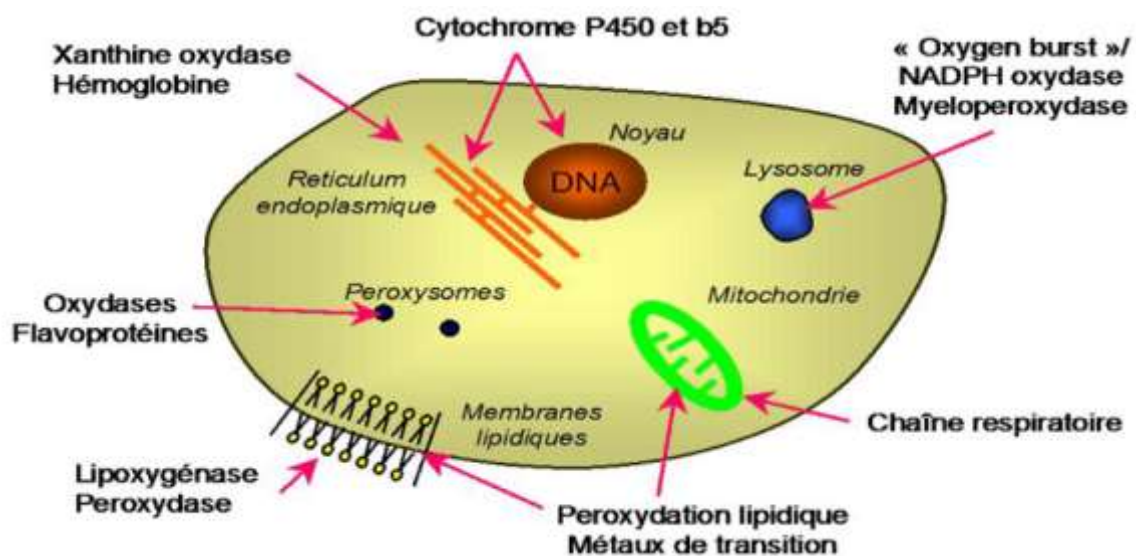


Figure 14 . Sources endogènes des espèces réactives d'oxygène (Rezaire., 2012)

#### 1.4. Antioxydants

Afin de limiter les effets nocifs des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène (ERO), notre organisme possède de ses propres systèmes de défense antioxydants, mais d'autres sont fournis par l'alimentation. Ces molécules sont aptes à ralentir, retarder ou prévenir les processus d'oxydation. Du point de vue biologique, on appelle les antioxydants toute substance qui, lorsqu'elle se trouve en faibles concentrations par rapport à celles d'un substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Shimizu., 2004).

En effet, les cellules disposent d'un ensemble complexe de défenses anti-oxydantes. Celles-ci peuvent être divisées en systèmes non enzymatiques ; apportés par une

alimentation saine et équilibrée sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque. En outre, certains oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc, cofacteurs des enzymes antioxydantes et des systèmes enzymatiques constitués d'enzymes (superoxyde dismutase (SOD), catalase et glutathion peroxydase (GPX)), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases (Saffidine., 2015).

Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires.

**Tableau 1 . Les composés antioxydants majeurs des cellules (Benabed., 2018)**

Catégorie	Structure	Site	Actions
<b>Systèmes enzymatiques</b>			
<b>Superoxyde dismutase (SOD)</b>	Cu/Zn SOD	Le cytosol aussi le noyau	Dismutation d' $O_2^{\cdot-}$ en $H_2O_2$
	MnSOD	La mitochondrie	
	CuSOD	Le plasma	
<b>Catalase</b>	Homoprotéine tetramérique	Peroxisomes	Dismutation de l' $H_2O_2$ et réduction de l'éthyl et le méthyl hydroperoxyde
<b>Cycle redox de GSII</b>			
<b>GSH peroxydase</b>	Selenoprotéine	Cytosol, aussi la mitochondrie	Réduction d' $H_2O_2$ et autres hydroperoxydes (peroxydes de lipides, produits de lipoxygénase)
<b>GSH réductase</b>	Protéine dimérique	Cytosol, aussi la mitochondrie	Réduction de disulfides à faible poids moléculaire
<b>Composés liposolubles</b>			
<b><math>\alpha</math>-tocophérol (Vitamine E)</b>	Vitamine liposoluble	Fluides extracellulaires	Conversion d' $O_2^{\cdot-}$ et $\cdot OH$ et les radicaux peroxydes des lipides en des formes moins réactives

<b><math>\beta</math>-carotène</b>	Précurseur de la vitamine A	Membranes	Piégeage d' $O_2^{\cdot-}$ , et réagit directement avec les radicaux peroxy
<b>Bilirubine</b>	Produit du catabolisme d'hémoprotéine	Sang, tissus	Réagit avec $ROO^{\cdot}$
<b>Composés hydrosolubles</b>			
<b>Acide ascorbique (Vitamine C)</b>	Vitamine hydrosoluble	Large distribution dans les liquides intra et extracellulaires	Piégeage direct d' $O_2^{\cdot-}$ , et $\cdot OH$ , neutralise les oxydants des neutrophiles stimulés
<b>Acide urique</b>	Base purine oxydée	Large distribution	Piégeage d' $\cdot OH$ $O_2^{\cdot-}$ prévient l'oxydation de la vitamine C, se lie aux métaux de transition
<b>Glucose</b>	Carbohydrate	Large distribution	Piégeage d' $\cdot OH$
<b>Cystéine</b>	Acide aminé	Large distribution	Réduction de plusieurs composés organiques
<b>GSH (glutathion)</b>	Tripeptide	Intracellulaire	Réaction direct avec $O_2^{\cdot-}$ , et $\cdot OH$ et les radicaux libres organiques

En tant qu'agents terminaux (piégeage de radicaux), les antioxydants transforment les radicaux en composés plus stables par résonance mésomérique et bloquent la phase de propagation (**Behera., 2006**).

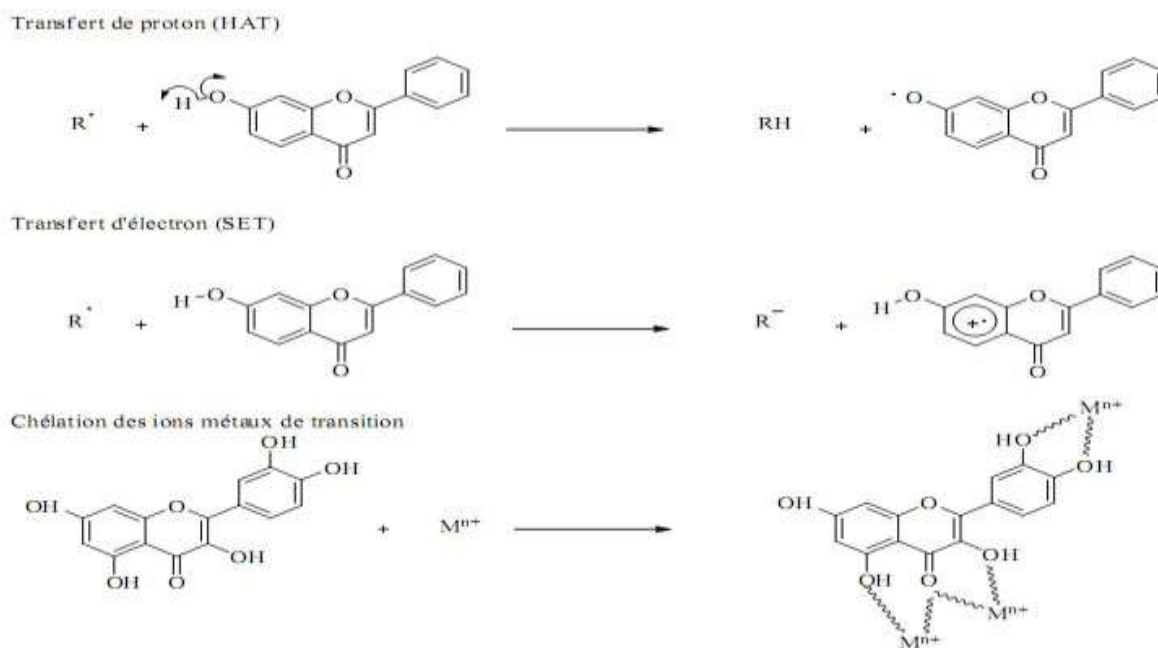
La réaction d'oxydation est souvent une réaction en chaîne, les anti-oxydants bloquent cette chaîne et empêchent ainsi les radicaux libres d'attaquer les cellules du corps. Les anti-oxydants vont se lier aux radicaux libres et réalisent une réaction d'oxydation avec eux, ce qui va les rendre inoffensifs et donc rendre impossible leurs oxydations par les protéines ou les acides gras (**Fettah., 2019**).

### 1.5. Polyphénols naturels comme antioxydants

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante et anti-radicalaire aussi importante. Ils

peuvent agir en tant qu'agents réducteurs, donneurs d'hydrogène, chélateurs de métaux et piègeurs d'oxygène singulet (Sarma., 2011).

Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Figure 15).



**Figure 15 . Mécanismes d'action antioxydante des composés phénoliques (Leopoldini *et al.*, 2011)**

Différents mécanismes d'action ont été décrits dans la littérature pour expliquer cette activité antioxydante des polyphénols :

### A. Piégeage des radicaux libres

Le principal mode d'action de l'activité antioxydante des polyphénols est l'interruption de la chaîne de propagation des réactions radicalaires. Les composés phénoliques (P-OH) sont capables de piéger les radicaux libres (X•) par transfert d'un électron ou d'un hydrogène :



L'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, d'un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire. Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées (Boubekri., 2014).

Les radicaux intermédiaires aryloxy (**P-O'**) formés sont relativement stables en raison de la résonance (délocalisation de l'électron non apparié sur l'ensemble du cycle aromatique) et donc une nouvelle réaction en chaîne n'est pas facile à initier. Par ailleurs, ce radical peut évoluer selon divers processus en réagissant avec d'autres radicaux libres, d'autres antioxydants ou des biomolécules pour former un produit d'addition chimiquement stable selon la réaction :



Notons que l'activité anti-radicalaire a été corrélée avec le potentiel d'oxydation des polyphénols (**Van Acker., 1996**).

Le radical aryloxy formé est stabilisé par résonance (délocalisation de l'électron non apparié sur l'ensemble du cycle aromatique) ; la propagation des réactions radicalaires sera donc freinée. Par ailleurs, ce radical peut évoluer selon divers processus en réagissant avec d'autres radicaux, d'autres antioxydants ou des biomolécules pour former un produit d'addition chimiquement stable. Notons que l'activité anti-radicalaire a été corrélée avec le potentiel d'oxydation des polyphénols (**Van Acker., 1996**).

Les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour le piégeage des radicaux libres, parce qu'ils possèdent :

- ✓ des groupes phénoliques hydroxyles qui sont susceptibles de donner un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre.
- ✓ un système aromatique stabilisé par la résonance.

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de cette activité antioxydante, ils inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce aux groupements hydroxyles fortement réactifs selon la réaction suivante.



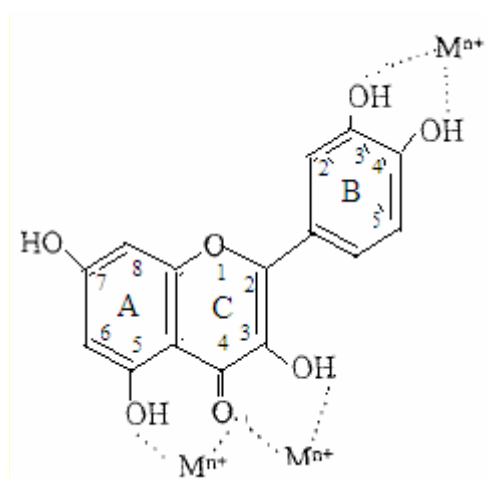
Les radicaux flavonoxy (Fl-O') produits peuvent interagir avec d'autres radicaux pour former des structures plus stables (**Marfak., 2003**).

## B. Chélation des ions métalliques

Les polyphénols peuvent également agir en chélatant des métaux de transition (tels les ions de fer et de cuivre) largués de leur protéine de fixation ou de transport. En outre, ils

accélèrent la formation d'espèces oxygénées réactives. Ces ions métalliques renforcent les effets nocifs du stress oxydant, en stimulant la production des radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\cdot$ ). Ces composés en chélatant les ions métalliques forment des complexes de coordination avec ces métaux en occupant tous les emplacements, et peuvent ainsi convertir les ions métalliques en complexes insolubles empêchant leurs interactions avec les intermédiaires lipidiques (Lee *et al.*, 2004).

D'après des études réalisées par Van Acker *et al.* (1996) la principale contribution à la chélation des ions métalliques (Figure 16) est due au noyau catéchol sur le cycle B, aux groupes 3-hydroxyle et 4-oxo d'hétérocyclique C, et aux groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre l'hétérocyclique C et A et on considère la quercétine la plus active des flavonoïdes grâce aux 3 sites de complexation qu'elle possède et qui lui permet de chélater les métaux. (Madi., 2018)



**Figure 16 .** Les flavonoïdes et leurs sites de chélation des ions métalliques ( $\text{Mn}^+$ )

### C. Inhibition des enzymes

Certains polyphénols sont des inhibiteurs d'enzymes, dont les oxydo-réductases, qui font intervenir au cours de leur cycle catalytique des espèces radicalaires (lipoxygénase, xanthine oxydase, protéine kinase, monooxygénase...).

En raison de la présence de multiples fonctionnalités phénol, ils interagissent avec les protéines si fortement que la précipitation des complexes protéines-polyphénols est fréquente, ce qui est à la base de leur utilisation dans le processus de tannage du cuir (Boubekri., 2014).

Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes dont l'inhibition d'une grande variété d'enzymes ainsi que le processus de transcription de certains gènes (par interaction du cytosol avec les facteurs de transcription ou certains précurseurs) (**Bruneton., 1999**).

La xanthine oxydase est considérée comme une source biologique importante du radical superoxyde lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en acide urique. Elle catalyse la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique.

En effet, les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de cette enzyme et par conséquent peuvent faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et de radicaux superoxydes dans les tissus humains (**Cos et al., 1998**). D'autres études ont établi que les polyphénols sont habiles d'inactiver l'histidine décarboxylase, l'aldose réductase, la NADPH oxydase, la protéine kinase C, les enzymes de l'inflammation telles la cyclooxygénase, la lipooxygénase, et la phospholipase A2 entre autres (**Dangles et Dufour., 2008**).

### 1.6. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro*

Plusieurs méthodes sont disponibles pour évaluer, *in vitro*, l'activité antioxydante des substances naturelles, elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron unique (**Benhammou., 2011**).

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique à l'aide d'un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété s'exprime par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (**Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998**). Comme les tests à l'acide thiobarbiturique (TBA), au  $\beta$ -carotène et aux diènes conjugués.

Alors, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité de piégeage des radicaux libres ou de certains métaux, c'est le cas des tests : DPPH, ABTS, FRAP...

Le **Tableau 2** regroupe les tests les plus utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels, en mentionnant les mécanismes réactionnels, les avantages et inconvénients de chaque méthode.

Les résultats des activités antioxydantes sont généralement exprimés en fonction d'une molécule de référence possédant de forte propriété antioxydante (trolox, quercetine, rutine...).

**Tableau 2 .** Les tests les plus utilisés pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro*

Test	Mécanismes réactionnels	Nature des molécules testées	Expression des résultats	Générateur de radicaux	Standard	Références
<b>DPPH</b>	Transfert d'électron majoritaire	Hydrophiles et lipophiles	CI <sub>50</sub> et/ou en ou $\mu$ mol équivalent d'une molécule de référence (Trolox).	DPPH	Trolox	<b>(Brand-Williams <i>et al.</i>, 1995 ; Pinelo <i>et al.</i>, 2004)</b>
<b>ABTS</b>	Transfert d'électron et de proton	Hydrophiles	CI <sub>50</sub> et/ou en ou $\mu$ mol équivalent d'une molécule de référence (Trolox)	ABTS + horseradisch peroxydase+peroxyde d'hydrogène formation du radical (ABTS•+)	Trolox	<b>(Chen, 2004)</b>
<b>FRAP</b>	Transfert d'électron	Hydrophiles et lipophiles	En mg ou $\mu$ mol équivalent Fe <sup>2+</sup>	Réduction du Fe (III) (TPTZ) 2 Cl <sub>3</sub>	Fe (II)	<b>Prior <i>et al.</i>, 2005</b>
<b>ORAC</b>	Transfert de proton	Hydrophiles et lipophiles	CI <sub>50</sub> et/ou en ou $\mu$ mol équivalent d'une molécule de référence (Trolox)	2.2-azobis (2-amidinopropane) dichlorohydrate (APPH) radicaux peroxydes de nature hydrophile	Trolox	<b>Lopez <i>et al.</i>, 2003)</b>

## 2. L'activité antidiabétique des composés phénoliques

Devant la complexité de la maladie que soit sur le plan génétique ou métabolique, et de sa forte prévalence mondiale, la découverte de nouvelles molécules antidiabétiques plus efficaces et moins onéreuses est aujourd'hui un domaine de recherche très intéressant.

La médecine traditionnelle connaît un regain d'intérêt et de nombreux diabétiques y ont régulièrement recours. Plus de 1200 espèces de plantes, utilisées en médecine traditionnelle, ont des propriétés antidiabétiques. Cependant pour la plupart d'entre elles, les rapports scientifiques ne sont pas encore élucidés. (**Kim et al., 2006**). La valorisation des plantes médicinales utilisées pour le traitement du diabète sucré et de leurs dérivés est une partie importante de ce domaine (**Kada., 2018**).

Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires, dont plus de 200 ont une activité hypoglycémiant. Ainsi, un certain nombre de groupes, tels que les alcaloïdes, les saponines, les flavonoïdes, les glycosides, les polysaccharides, les peptidoglycanes, les acides aminés et autres, obtenus à partir de diverses sources végétales, semblent avoir des effets, d'une importance particulière, dans le traitement du diabète. (**Mukherjee et al., 2006**).

L'Algérie, de part sa position géographique, bénéficie d'un climat très diversifié, les plantes poussent en abondance dans les régions côtières, montagneuses et également sahariennes. Ces plantes constituent des remèdes naturels potentiels qui peuvent être utilisés en traitement curatif et préventif (**Belouad., 1998 ; Azzi., 2013**).

La région de Laghouat, a un riche patrimoine de plantes médicinales à l'échelle de la diversité, les informations ethnobotaniques recueillies par **Khacheba et Djeridane** en **2014** confirment l'importante qu'occupe ce patrimoine végétal dans la pharmacopée traditionnelle et surtout dans le traitement du diabète.

### 2.1. Définition du diabète sucré

Le diabète sucré est une maladie métabolique, touchant le métabolisme glucidique, lipidique et protéique, caractérisée par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de sécrétion et/ou d'action de l'insuline (**Kuzuya et al., 2002**).

Il se reconnaît par une élévation chronique de la glycémie accompagnée d'une polydipsie, d'une polyurie, d'une asthénie, d'une polyphagie, d'un amaigrissement ou obésité et des troubles de la conscience aboutissant à un coma mortel (**Azzi., 2013**).

Le diabète sucré se définit aussi comme une hyperglycémie chronique, soit une glycémie à jeun supérieure à 1,26g/l (7mmol/l) ou une glycémie supérieure à 2g/l (11,1mmol/l) à n'importe quel moment ou lors d'une hyperglycémie provoquée par voie orale à deux reprises (**Massebeuf., et Sachon., 2004**).

## 2.2. Classification de diabète sucré

### 2.2.1 Le diabète de type 1 (anciennement insulino-dépendant DID)

Représente 10 % environ des cas de diabète et apparaît le plus souvent de manière brutale chez l'enfant ou le jeune adulte, suite à une destruction auto-immune des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans pancréatiques. L'hyperglycémie apparaît lorsqu'il ne reste plus que 10 à 20% de cellules  $\beta$  fonctionnelles. Elle est liée à un déficit en insuline (**Zerriouh., 2008**).

### 2.2.2. Le diabète de type 2 (anciennement appelé le diabète non insulino-dépendant DNID)

C'est la forme de diabète la plus répandue représentant près de 90% des cas diagnostiqués. Ce type de diabète se manifeste communément chez les adultes après l'âge de 40 ans, mais son incidence augmente rapidement chez les plus jeunes. Il est très répandu et représente 90 % des cas de diabète (**Boussoussa., 2016**). Est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie, résultant d'une diminution de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques, notamment les muscles, et d'une diminution de la capacité du foie à produire du glucose. (**Slama-Chaudhry et al., 2013**).

### 2.2.3. Le diabète gestationnel

Il s'agit d'un trouble de la tolérance glucidique entraînant une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse.

Cette forme de diabète est généralement transitoire et disparaît dans les semaines suivant l'accouchement. Il existe cependant un risque plus élevé de 50% permanente d'un diabète lors d'une grossesse ultérieure. Les femmes ayant souffert de diabète gestationnel risquent davantage de développer un diabète type 2 par la suite (**Pirosa et al., 2019**).

### 2.2.4. Autres types de diabète : le diabète secondaire (spécifique)

Le diabète sucré peut être secondaire à une pancréatopathie (pancréatite chronique ou aiguë, tumeur, l'hémochromatose), à diverses endocrinopathies (phéochromocytomes, acromégalie, syndrome de Cushing, hyperthyroïdie, tumeurs endocrines pancréatiques et

digestives) à des dysfonctionnements d'origine génétique des cellules  $\beta$  (diabète MODY [Maturity Onset Diabetes of the Young] et diabète mitochondrial). Elle peut également être à l'origine des médicaments, de composés chimiques ou de composés toxiques. (**Azzizi; Maugendre et al., 2007**).

### 2.3. Épidémiologie

À l'échelle mondiale, on estime que 422 millions d'adultes vivaient avec le diabète en 2014, contre 108 millions en 1980. La prévalence mondiale du diabète (normalisée selon l'âge) a presque doublé depuis 1980, passant de 4,7 à 8,5 % de la population adulte. Le diabète a provoqué 1,5 million de morts en 2012. Une glycémie supérieure à la normale, qui accroît le risque de maladies cardiovasculaires et d'autres pathologies, a causé de 2,2 millions de décès supplémentaires (**OMS., 2016**).

De même, en 2010, la Fédération internationale du diabète (FID) a enregistré un million 632 milles diabétiques en Algérie. Ce chiffre pourrait atteindre jusqu'à 2 millions 850 milles en 2030, avec une augmentation de 61 milles nouveaux cas par an. La prévalence mondiale, déclarée par FID, était de 8,5% et la prévalence nationale de 7,4 %. Elle pourrait atteindre plus de 9,3 % en 2030 (**Whiting, 2011**).

### 2.4. Complication du diabète

Quel qu'en soit son type, le diabète peut entraîner des complications qui affectent de plusieurs parties de l'organisme et accroître le risque général de décès prématuré. Au nombre des complications possibles figurent l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral, l'insuffisance rénale, l'amputation des jambes, la perte de vision et des lésions nerveuses. Pendant la grossesse, un diabète mal maîtrisé accroît le risque de mortalité intra-utérine et d'autres complications (**Reddy et al., 2009; OMS., 2016**).

La physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré met en jeu des facteurs métaboliques, vasculaires et génétiques qui interagissent les uns avec les autres. Parmi les facteurs métaboliques, on distingue l'accélération de la voie des polyols, la glycation des protéines, les anomalies du métabolisme des acides gras essentiels, l'augmentation de la voie oxydative, la carence en peptide-C et la production accrue de facteurs de croissance.

Les facteurs vasculaires sont représentés par une diminution de la synthèse de l'oxyde nitrique et une augmentation de l'activité de la protéine-kinase C.

Les facteurs génétiques impliqués concernent principalement la néphropathie, avec en particulier un polymorphisme du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, et la neuropathie avec un polymorphisme du gène de la Na/K ATPase, qui pourraient expliquer la prédisposition ou la protection de certains patients vis-à-vis de ces complications (**Azzi., 2013**).

## **2.5. Traitements**

### **2.5.1. Traitements non médicamenteux**

Le traitement du diabète de type 1 repose sur la prescription vitale d'insuline associée à la diététique, une activité physique, une autosurveillance, une éducation et un suivi médical régulier (**Gérard., 2005**).

La réduction pondérale et l'activité physique régulière (adaptée et contrôlée) ont un effet favorable prouvé sur le contrôle de la glycémie, ce dernier ayant un effet favorable sur l'insulinorésistance.

Le traitement initial du diabète de type 2 repose essentiellement sur le régime alimentaire équilibrée et l'exercice physique. Les fonctions musculaires et articulaires diminuent les dépôts graisseux, en particulier abdominaux, liés à l'insulinorésistance et à ses conséquences avec fréquemment une perte de poids (**Halimi., 2005**).

### **2-5-2- Traitements médicamenteux**

#### **➤ Hypoglycémiant oraux**

Les antidiabétiques oraux entraînent une normalisation de la glycémie dans moins de 50% des cas. Ils n'ont pas d'effet régressif sur les lésions installées et sont contre-indiqués dans les insuffisances rénales et hépatiques. Leurs effets secondaires ne sont pas négligeables (**Tossou et al., 1995**).

Cinq classes d'antidiabétiques oraux exerçant des effets hypoglycémiant par des mécanismes d'action différents sont à la disposition des cliniciens prenant en charge les diabétiques de type 2 insuffisamment contrôlés par le régime seul : (**Dey et al., 2002**).

- ❖ Les sulfamides hypoglycémisants (Glibenclamide) : stimulent la sécrétion d'insuline sans influencer sa synthèse.
- ❖ Les biguanides (la metformine) : réduisent l'insulino-résistance en favorisant l'action de l'insuline sur les tissus cibles, en inhibant la néoglucogenèse hépatique et en diminuant l'absorption intestinale du glucose sans aucun effet sur la sécrétion d'insuline.
- ❖ Les inhibiteurs d' $\alpha$ -glucosidases intestinales représentés par l'acarbose et le miglitol : ralentissent l'absorption digestive des glucides complexes. **(Halimi., 2005)**.
- ❖ Les glitazones : ce sont des molécules qui augmentent la sensibilité à l'insuline et la fonction  $\beta$  cellulaire.
- ❖ Les glinides : ce sont des insulino-sécréteurs.

### ➤ **Insulinothérapie**

En cas d'échec du traitement antidiabétique oral chez le diabétique de type 2, il paraît nécessaire d'instaurer l'insulinothérapie précocement pour préserver le capital insulinosécrétoire résiduel. L'insulinothérapie permet dans ce cas d'obtenir une amélioration nette du contrôle glycémique **(Monnier et Colette., 2010)**.

L'insulinothérapie définitive devient bien évidemment nécessaire en cas de contre-indication à la poursuite des antidiabétiques oraux (insuffisance rénale, hépatique...).

Les préparations d'insuline sont classées en fonction de leur durée d'action, de leur délai d'action et du moment de leur activité maximale. L'insulinothérapie doit être individualisée selon les objectifs thérapeutiques, du mode de vie, de l'alimentation, de l'âge, de l'état général de santé, de la motivation, de la capacité du sujet de reconnaître l'hypoglycémie et des aptitudes en matière d'autogestion. Malgré tous les médicaments, traitements et mesures hygiéno-diététiques qui existent actuellement, il reste difficile de réguler le taux de glucose dans le sang du patient diabétique. **(Harper et al., 2013)**.

### ➤ **Nouvelles classes d'antidiabétiques**

Les nouveaux agents antidiabétiques mettent à profit de systèmes de régulation non exploités jusqu'ici dans le traitement du diabète : les systèmes incrétones et endocannabinoïdes **(Xiao., 2008)**.

Les incrétines sont des hormones peptidiques produites par la muqueuse digestive lors du passage du bol alimentaire, et jouent un rôle sur la satiété.

La plus connue des incrétines est le *glucose-dependent insulinotropic peptide* (GIP) et le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1), sont des hormones peptidiques qui potentialisent l'effet du glucose sur la sécrétion d'insuline. Elles sont libérées par des cellules endocrines de l'épithélium intestinal lors du passage des nutriments.

Par ailleurs, ces hormones sont dégradées très rapidement en métabolites inactifs à cause de leur très courte demi-vie par l'enzyme *dipeptidyl peptidase-4* ou (DPP-4). L'intérêt des scientifiques s'est porté sur le maintien de cette enzyme en développant (**Tan et Pillon., 2009**).

- ✓ des analogues du GPL-1 résistants à la dégradation par l'enzyme DPP-4, ce qui permet le contrôle de la glycémie et a un rôle positif sur le contrôle du poids ;
- ✓ des inhibiteurs de la DPP-4, permettant de retarder la dégradation du GLP-1.

## 2.6. Traitement du diabète par les produits naturels dérivés de plantes

L'utilisation des plantes médicinales sous différentes formes, brutes ou préparées s'est considérablement élargie. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 80% de la population globale dépend de la médecine traditionnelle et de la phytothérapie pour les soins sanitaires, ce qui semble être une solution acceptable.

Une des originalités majeures des végétaux réside dans la capacité à produire des substances naturelles très diversifiées (**Macheix et al., 2005**). En effet, près d'un quart des remèdes qui existent actuellement sont à base de ces substances végétales ou produits de synthèse botanique, grâce à leur richesse en produits dits métabolites secondaires.

La médecine traditionnelle basée sur l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement de nombreuses maladies, dont le diabète sucré, est une pratique ancestrale qui continue à être utilisée. (**Marles., 1995 ; Bailey., 2014**).

Plusieurs enquêtes ethnopharmacologiques et expérimentales ont été menées à travers le monde pour recenser les plantes antidiabétiques utilisées dans les différentes pharmacopées traditionnelles.

Jusqu'à l'heure actuelle, près de 1123 espèces de plantes dans le monde entier sont connues pour leur propriétés hypoglycémiantes et antihyperglycémiantes. Ces plantes appartiennent à plus de 725 genres et 183 familles, dont les familles les plus étudiées pour leurs effets d'hypoglycémie incluent : les familles Fabaceae, Asteraceae, Lamiacée, Liliaceae, Poaceae, Cucurbitacées, Moracées, Rosacées, et Euphorbiaceae (**Mukherjee et al., 2013 ; Zerriouh.,2008**).

Les investigations ethnopharmacologiques sont actuellement centrées sur la validation expérimentale des propriétés curatives, traditionnellement attribuées à ces remèdes. Dans 80 % des cas, les indications traditionnelles de plantes antidiabétiques ont été expérimentalement confirmées.

Pour plusieurs plantes, les composés actifs responsables de l'activité pharmacologique ont été identifiés et isolés et les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets thérapeutiques ont été partiellement ou complètement élucidés.

Ces composés actifs appartiennent à plusieurs classes chimiques parmi lesquels les composés phénoliques occupent une place très importante dans le traitement du diabète.

Par conséquent, de nombreux efforts ont été faits pour découvrir de nouvelles sources antidiabétiques provenant de différentes plantes médicinales traditionnelles. Des recherches sont en concurrence pour trouver de nouveaux agents thérapeutiques pour le traitement du diabète efficaces et sans danger.

Plusieurs études ont rapporté l'isolement d'inhibiteurs d' $\alpha$  - amylase et d' $\alpha$  - glucosidase d'extraits de plantes. Ces inhibiteurs isolés ont été rapportés pour leurs efficacités pour diminuer la glycémie avec des effets secondaires minimales (**Shobana et al., 2009**).

Une approche thérapeutique pour diminuer l'hyperglycémie est de retarder et réduire la digestion et l'absorption des glucides ingérés (tels que l' $\alpha$ -amylase et / ou l' $\alpha$ -glucosidase) dans le tube digestif (**Khecheba et al., 2014**). Les inhibiteurs de ces enzymes retardent la digestion des glucides et prolongent le temps global de la digestion des glucides, provoquant une réduction de la vitesse d'absorption du glucose et, par conséquent, l'émoussement de la glycémie plasmatique postprandiale (**Rhabasa-Lhoret et Chiasson., 2004**).

Les enzymes  $\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1) et les  $\alpha$ -glucosidases (EC 3.2.1.20) appartiennent à la superfamille des  $\alpha$ -amylases, sont des carbohydrolases responsables de l'hydrolyse des oligo et/ou disaccharides en monosaccharides, unités simples assimilables par l'organisme (**Muhammad Jihad., 2018**).

Les  $\alpha$ -amylases ( $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucanohydrolases ou  $\alpha$ -glucohydrolase de D-glucoside) et les  $\alpha$ -glucosidases sont des enzymes hydrolytiques appartenant à la famille des hydrolases, qui catalysent la coupure hydrolytique des liaisons C—O, C—N et C—C (**Karatas., 2013**). Elles hydrolysent spécifiquement la liaison  $\alpha$ -D-(1,4)-glucosidiques trouvées dans la composition du glycogène, l'amidon et autres oligosaccharides (hydrates de carbone relatifs) soit à partir de l'extrémité non réductrice ( $\alpha$ -amylase) ou l'extrémité réductrice ( $\alpha$ -glucosidase) donnant naissance à n résidus de D-glucose assimilables (**Kumar et al., 2017**).

### 2.7. Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase

L'  $\alpha$ - amylase (1,4-glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) est une enzyme clé du système digestif sécrétée par les glandes pancréatiques et salivaires chez les mammifères. Elles existent dans le règne vivant, chez les animaux, les plantes supérieures et les microorganismes. C'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases, de la classe des hydrolases qui catalyse l'étape initiale d'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ - 1,4-glycosidiques dans l'amidon, du glycogène, et d'autres oligo et polysaccharides apparentés. Son action fournit dès le début un mélange de glucose, de maltose et de dextrans. En fin de réaction elle fournit du glucose et des résidus correspondant aux liaisons  $\alpha$ - (1-6) situées aux points de ramification des chaînes (**Alais et al., 2008** ).

Les  $\alpha$ - amylases sont des métallo enzymes à calcium (un ion calcium  $\text{Ca}^{2+}$  par molécule) .Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés de l'enzyme (**Chiba et al. 1988**).

L'alpha-amylase pancréatique est une enzyme clé du système digestif et catalyse l'étape initiale de l'hydrolyse de l'amidon en maltose et finalement en glucose. La dégradation de cet amidon alimentaire se fait rapidement et conduit à une hyperglycémie postprandiale élevée (PPHG). Il a été démontré que l'activité de l' $\alpha$ -amylase pancréatique humaine (HPA) dans l'intestin grêle est corrélée à l'augmentation du taux de glucose postprandial. Par conséquent, l'inhibition de ces systèmes enzymatiques réduit le taux de digestion des

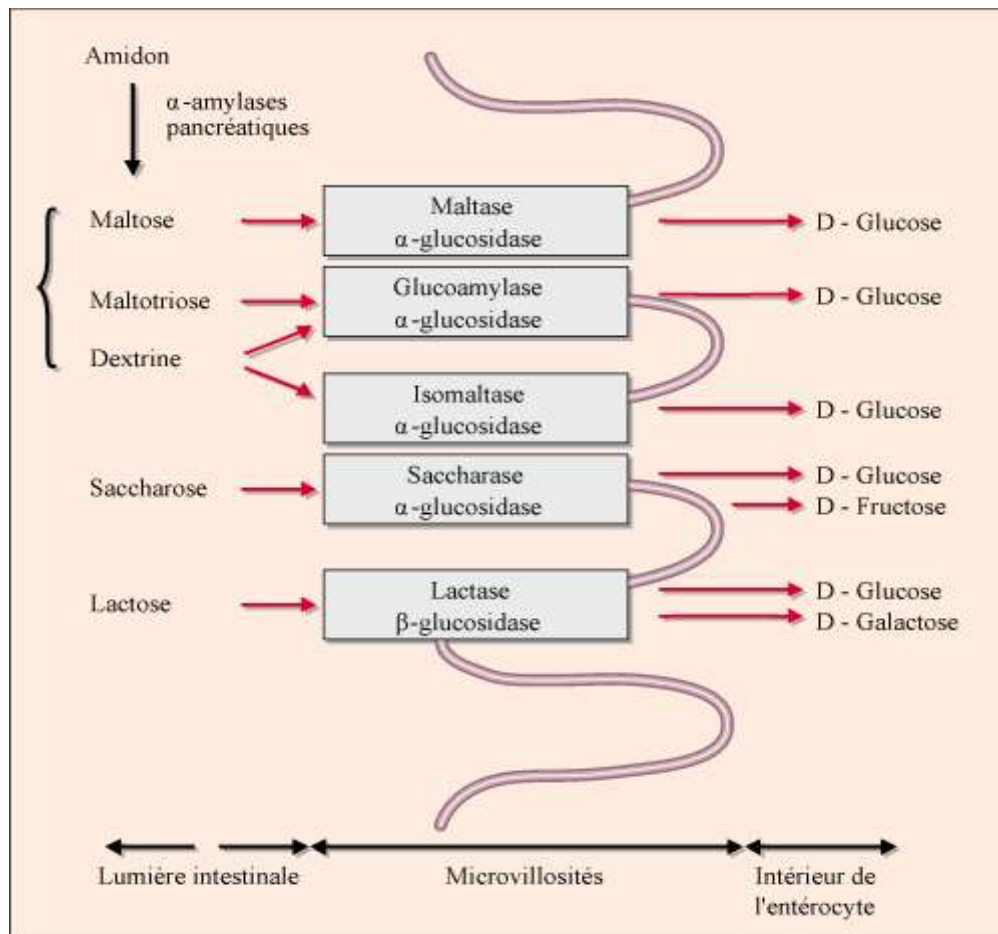
glucides, la satiété et la perte de poids, et prolonge le vide gastrique. Ils ont donc un potentiel thérapeutique pour le traitement de l'obésité et du diabète non insulino-dépendant (Gerrard *et al.*, 2000).

### 2.8. Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase

Les  $\alpha$ - glucosidases (EC 3.2.1.20,  $\alpha$ - D-glucoside glucohydrolase) sont les enzymes qui catalysent l'hydrolyse sélective des liaisons  $\alpha$ - 1,4- glycosidiques dans les polysaccharides pour libérer un  $\alpha$ - D-glucose et provoque l'augmentation du glucose sanguin postprandial. L'inhibition de cette enzyme peut effectivement diminuer le taux de glucose postprandial. Ceci est bénéfique pour les patients diabétiques particulièrement. Par conséquent, Les inhibiteurs de l'  $\alpha$ - glucosidase inhibent de façon compétitive les enzymes de type  $\alpha$ - glucosidase localisés dans la bordure du petit intestin. Ils diminuent la dégradation du sucrose et des carbohydrates complexe (amidon), et réduisent l'absorption des carbohydrates de l'intestin.8 les inhibiteurs d'alpha-glucosidase abaissent le taux d'insuline pendant les période de jeûne ou post-prondiale et ont un profil inférieur concernant le contrôle glycémique et les effets nuisibles (Van de Laar *et al.*, 2005 ; Khanal et Patil., 2019).

### 2.9. Mécanisme d'action des inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase

Dans le processus digestif des hydrates de carbone diététiques complexes, l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ - amylase jouent un rôle important. Les amylases font partie d'une classe plus large d'enzymes hydrolytiques appelées les glycosidases, clivent les liaisons glycosidiques de l'amidon dormant en fragments disaccharide qui sont plus tard décomposés en glucose. Donc, l'inhibition de ces deux enzymes peut retarder la digestion des oligosaccharides et des disaccharides, et retarder l'absorption du glucose ainsi que réduire les taux de glucose dans le plasma, aboutissant finalement la suppression de l'hyperglycémie postprandiale (Lebovitz., 1997 ; Amiri *et al.*, 2019 ) (Figure 17).



**Figure 17.** Les principales étapes de la digestion des sucres (d'après Allannic, 1997)

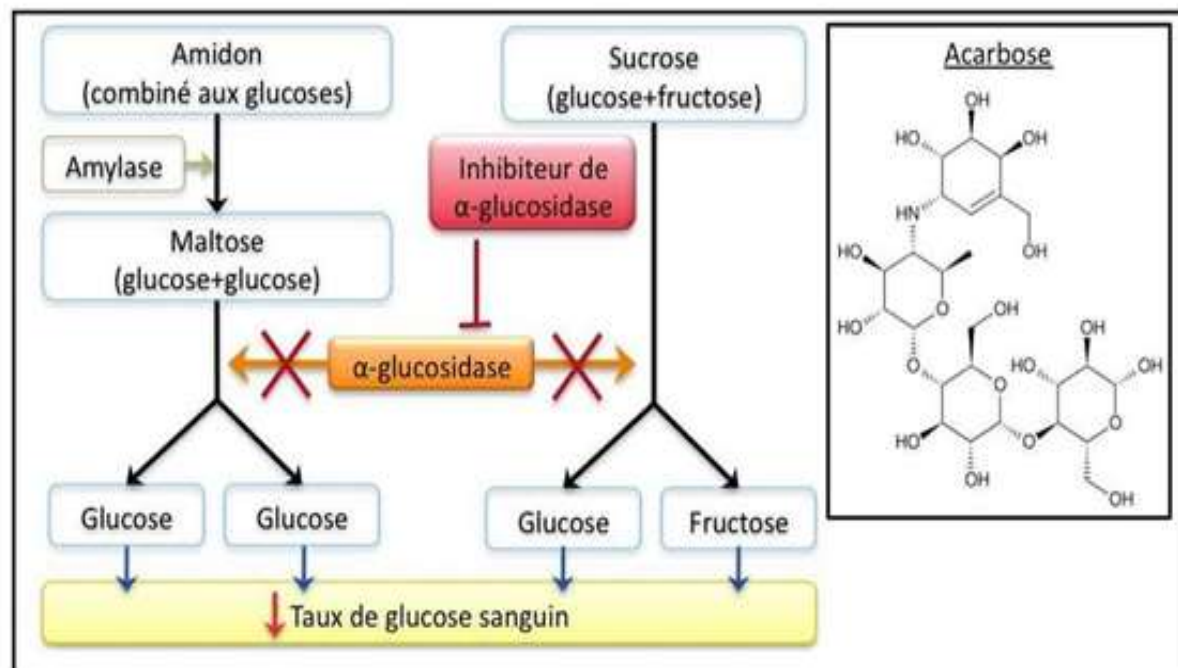
Il existe de nombreux médicaments synthétiques disponibles capables d'inhiber l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase et de l' $\alpha$ -amylase qui peuvent retarder la digestion des hydrates de carbone, réduisant ainsi l'hyperglycémie postprandiale tels que l'acarbose, voglibose et miglitol qui sont largement utilisés, en monothérapie ou en association avec des sécrétagogues de l'insuline, pour les patients atteints de diabète de type II (Lebovitz., 1998).

L'acarbose est un pseudotétrasaccharide d'origine bactérienne qui agit par inhibition compétitive et réversible des  $\alpha$ -glucosidases intestinales et l' $\alpha$ -amylase pancréatique, il joue le rôle de faux substrat et retarde ainsi l'hydrolyse des glucides complexes, ceci a pour conséquence un étalement du temps de passage sanguin du glucose avec réduction de l'hyperglycémie post prandiale sans entrainer une hyperinsulinémie (Nistor., 2010).

L'acarbose agit donc en diminuant l'hyperglycémie postprandiale n'entraîne pas d'hyperinsulinisme. Le miglitol est un pseudo-monosaccharide qui présente le même mécanisme d'action et qui réduit également la glycémie à jeun (**Chiasson *et al.*, 2003**).

Cependant, ces médicaments peuvent causer des troubles hépatiques et d'autres symptômes gastro-intestinaux tels que les diarrhées. En outre, certains d'entre eux peuvent augmenter l'incidence des tumeurs rénales, des lésions hépatiques et des hépatites aiguës (**Shobana *et al.*, 2009**).

Aujourd'hui, les produits à base de plantes sont très demandés pour le traitement du diabète, en particulier le diabète de type 2. Le règne végétal est un vaste domaine pour rechercher des agents hypoglycémisants oraux efficaces qui ont des effets secondaires légers ou pas en plus de leur faible coût. Par conséquent, les inhibiteurs naturels de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase provenant de sources végétales offrent une stratégie attrayante pour le contrôle de l'hyperglycémie. Ceux-ci sont utilisés, actuellement, pour développer des aliments fonctionnels et des nutraceutiques pour les diabétiques (**Vongsak *et al.*, 2015 ; Chaib.,2018**).



**Figure 18 .** Mécanisme d'action des inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase. (**Karam., 2007**)

L'utilisation répandue des plantes dans le traitement de diverses maladies a montré que les plantes peuvent servir de sources et de source bon marché pour de nouveaux médicaments hypoglycémisants. De ce point de vue, de nombreuses plantes aromatiques sont devenues attrayantes pour les scientifiques en tant que source d'agents naturels qui peuvent être plus efficaces que les sources synthétiques (**Chaib., 2018**).

**Chethan et al. (2008)** ont indiqué que les phénols végétaux jouent un rôle de médiateur dans l'inhibition de l'amylase et par conséquent, ont le potentiel de contribuer à la gestion du diabète de type II et peuvent agir comme des inhibiteurs de l'amylase et glucosidase (similaire à l'acarbose, miglitol et voglibose) conduisant à une diminution de l'hyperglycémie (**Chethan et al., 2008**).

Les flavonoïdes naturels en tant qu'inhibiteurs de l' $\alpha$  - glucosidase, de l' $\alpha$  - amylase et reductases d'aldose ont fait l'objet de plusieurs recherches (**Kumar et al., 2017**). Les auteurs mentionnent que les flavonoïdes ainsi que leurs dérivés sucrés, sont des inhibiteurs efficaces de l' $\alpha$ -glucosidase, aussi une activité inhibitrice contre l' $\alpha$ -amylase par des flavonoïdes et les anthocyanes a été rapportée (**Andrade et al., 2007**).

### 3. L'activité antimicrobienne des composés phénoliques

La capacité d'une espèce végétale à résister aux attaques d'insectes et des micro-organismes est souvent corrélée à sa teneur en métabolites secondaires tels les polyphénols (**Bahorun., 1997**). De nombreux groupes de recherches ont démontré le rôle incontestable des composés phénoliques dans l'inhibition d'innombrables bactéries pathogènes et même toxiques, fongicides et des antibiotiques. Ces métabolites secondaires peuvent conduire à la diminution de l'activité enzymatique ainsi qu'à la croissance. D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle (**Singh et al., 2012 ; Fettah., 2019**).

Plusieurs études scientifiques ont montré l'efficacité des extraits phénoliques dans l'inhibition de la croissance microbienne telle que l'étude de **Chan et al., (2008)**. L'extrait flavonoïdiques de *Citrus ladaniferus* montre une efficacité importante contre un grand nombre de souches bactériennes, à savoir *Salmonella typhi*, staphylococcus aureus... (**Mohammedi., 2005**).

Citant entre autres l'étude réalisée par **Taghzouti et al. (2016)** qui se sont intéressés aux effets antimicrobiens des composés phénoliques extraits de l'espèce *Globularia alypum L.*, ces derniers ont montré une inhibition de croissance contre six souches testées dont 05 bactéries et un champignon (*Candida albicans*).

**Choi et al. (2006)** signalent que les composés phénoliques sont même habillés à neutraliser les toxines bactériennes grâce à plusieurs travaux entrepris ces dernières années.

D'après **Cowan (1999)** les acides caféique et cinnamique sont très efficaces contre les virus, les bactéries et les champignons. L'activité antivirale des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, est due principalement à leur pouvoir inhibiteur de la transcriptase inverse et de l'ADN polymérase des virus, tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV), et quelques adénovirus (**Derbel et Ghedira., 2005**).

### 3.1. Les infections microbiennes

Les maladies infectieuses représentent la cause majeure de morbidité, et de mortalité dans le monde ; ce sont des affections provoquées par des microorganismes pathogènes telles que les bactéries, les virus, les parasites ou les champignons et touchent des millions de personnes dans le monde (**Alwash et al., 2013**), les causes de ces phénomènes sont multiples mais le déterminant majeur est l'utilisation excessive et/ou inappropriée des antibiotiques (**Munita et Arias., 2016**). En effet, le rôle de l'exposition aux antibiotiques dans l'émergence de la multirésistance des bactéries est largement rapporté dans la littérature. Dans cette perspective, un grand intérêt a été porté à la recherche de nouvelles substances biologiquement actives et efficaces comme alternative à partir des ressources naturelles.

### 3.2. Résistance aux antibiotiques

La résistance microbienne est considérée comme le principal obstacle à la réussite du traitement des maladies infectieuses surtout par la dissémination de souches multi-résistantes. La résistance est susceptible d'entraîner une augmentation de la létalité de certaines infections bactériennes et représente donc une menace réelle (**Kada., 2018**).

La résistance étant un phénomène écologique résultant de la réponse des bactéries aux antibiotiques avec lesquels elles sont en contact. Elle est connue pour toutes les familles d'antibiotiques et concerne toutes les espèces bactériennes. Cette résistance provient de l'utilisation intensive d'antibiotiques à des fins humaines, vétérinaire et agricole, causant leur libération continue dans l'environnement et l'évolution des gènes résistants, les maladies d'immunosuppression peuvent causer aussi le développement de cette résistance **(Sivananthan., 2013)**.

Les bactéries peuvent développer une résistance aux antibiotiques à travers plusieurs mécanismes, notamment, la modification ou l'élimination des sites de liaison des agents antibactériens, la régulation de la production d'enzymes pouvant désactiver l'agent antimicrobien, le réglage ou la modification des canaux membranaires par lesquelles l'antibiotique traverse les cellules, le changement de la perméabilité cellulaire et le transfert horizontal de gènes de résistance **(Rodríguez-Rojas et al., 2013)**.

### **3.3. Traitement des infections bactériennes**

#### **3.3.1. Antibiotiques**

Les agents bactériostatiques et fongostatiques inhibent la croissance des bactéries et des champignons, respectivement. Par contre, les agents germicides (bactéricides et fongicides) tuent les germes pathogènes mais pas nécessairement les endospores. Il existe différentes classes d'agents antimicrobiens : chimiques (oxydants, alcools, aldéhydes et gaz), physiques (température et rayonnement) et chimio-thérapeutiques (antibiotiques) **(Fettah., 2019)**.

Les antibiotiques sont définis par Turpin. ; et Velu **(1957)** comme suit : « Tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimio-thérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose et d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des micro-organismes ou même de certaines cellules des êtres pluricellulaires ». **(Bergogne-Berezin et Dellamonica., 1995)**.

Il existe plus de 22 500 composés actifs biologiquement obtenus à partir des microorganismes, dont 45% proviennent d'actinomycètes, 38% des champignons et 17% d'autres bactéries. Environ 5 000 antibiotiques ont été identifiés à partir des cultures de bactéries à Gram négatif, Gram positifs et de champignons filamenteux (**Gebreyohannes et al., 2013**).

Certains antibiotiques sont naturels, ils sont synthétisés par des microorganismes tels que la vancomycine, la streptomycine, la pénicilline et la céphalosporine. D'autres antibiotiques sont semi-synthétiques (ampicilline) et résultent de la modification d'antibiotiques naturels par l'addition d'un groupe chimique. Plusieurs autres sont totalement synthétiques comme les sulfamides (**Chambers et Sande., 1998**).

### 3.3.2. Antimicrobiens naturels

Depuis quelques années, les recherches sont orientées vers la caractérisation de nouveaux agents antimicrobiens d'origine naturelle comme les peptides bactériens, les bactériophages et les molécules bioactives des plantes qui peuvent substituer les antibiotiques classiques ou agir d'une manière synergique avec ces derniers (**Kada., 2018**).

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules dotées pour la plupart d'une activité antibiotique, mais en général cette activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne. Les concentrations requises pour exercer une activité antimicrobienne sont donc plus élevées pour les molécules isolées des plantes que pour celles des bactéries et des champignons.

En effet, une molécule phytochimique est considérée comme \*antimicrobienne\* si elle inhibe la croissance des micro-organismes pour des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 100µg/ml et 1000 µg/ml. Pour les antibiotiques d'origine microbienne, des CMI variant de 0.01 µg/ml à 10 µg/ml sont suffisantes pour générer une activité inhibitrice (**Beddou., 2015**).

Parmi ces métabolites on trouve les polyphénols qui sont doués de diverses importantes activités antimicrobiennes, cette diversité est probablement reliée à leurs diversités structurelles.

### 3.4. Relation structure- activité des polyphénols

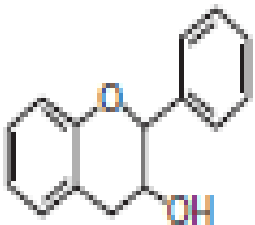
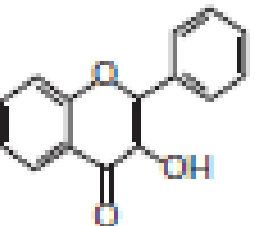
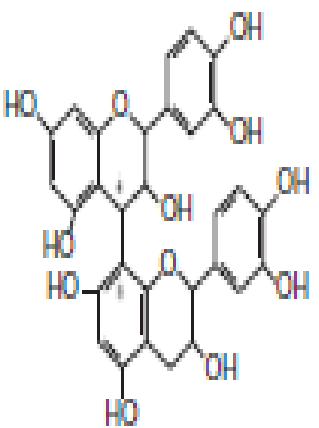
Les polyphénols sont doués d'une importante activité antimicrobienne, probablement dues à leurs diversités structurales (**Tableau 3**). Les sites et le nombre des groupements hydroxyles sur les constituants phénoliques sont supposés être reliés à leur toxicité relative envers les microorganismes avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité. Leur activité est probablement due à leur capacité à se complexer avec des protéines extracellulaires et à former des complexes avec les parois cellulaires bactériennes (**Cowan., 1999 ; Ferdjioui., 2018**).

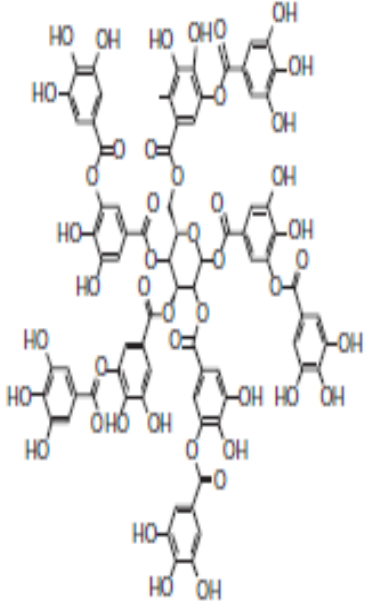
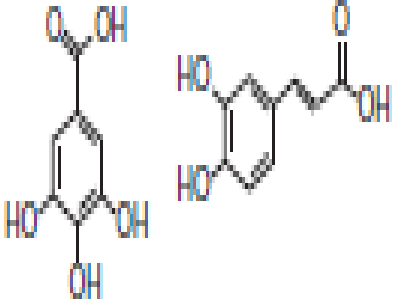
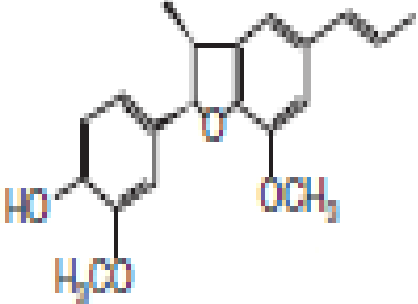
Les phénols sont généralement bactéricides contre les bactéries Gram+ et Gram-. Cet effet est probablement dû à l'inhibition de certaines enzymes (**Kada., 2018**). L'hydrophobie des polyphénols est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'insérer dans les phospholipides membranaires des bactéries et d'exercer leurs effets antibactériens (**Daglia., 2012**).

L'activité des flavonoïdes est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes (**Ulanowska et al., 2006**).

Les flavonoïdes sont capables aussi de détruire la membrane cytoplasmique des cellules bactériennes ou de changer sa fluidité). Les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins ont reçu plus d'attention dû à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols, à leur capacité d'éliminer un nombre de facteurs de virulence microbienne telles que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et neutraliser des toxines bactériennes, comme ils peuvent établir une synergie avec certains antibiotiques. Ainsi que de leur capacité à agir en synergie avec certains antibiotiques (**Daglia., 2012 ; Ferdjioui., 2018**).

**Tableau 3 .** Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne (Daglia., 2012)

Composés phénoliques	Microorganismes sensibles	Exemples
 <p><b>Flavane-3-ol</b></p>	<b>Bactéries</b>	<i>V.cholerae, S.mutans, C.jejuni, C.perfringes, E.coli, B. Cereus, H. pylori, S. aureus, L. acidophilus, A. naeslundii, P. gingivalis, P. melaninogenica, F. nucleatum, C. pneumonia</i>
 <p><b>Flavonole</b></p>	<b>Virus</b>	<i>Adénovirus, Entérovirus, Flu virus.</i>
	<b>Champignons</b>	<i>Candida albicans, Microsporium gypseum, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum.</i>
 <p><b>Tannins condensés</b></p>	<b>Bactéries</b>	<i>S.mutans, E.coli, S.aureus.</i>
	<b>Virus</b>	<i>Virus de l'influenza A, type -1 herpès simplex virus (HSV)</i>

 <p><b>Tannins hydrolysables</b></p>	<p><b>Bactéries</b></p>	<p>Différentes souches de :</p> <p><i>Salmonella,</i> <i>Staphylococcus,</i> <i>Helicobacter, E. coli,</i> <i>Bacillus, Clostridium,</i> <i>Campylobacter</i></p>
 <p><b>Acides phénoliques</b></p>	<p><b>Bactéries</b></p>	<p><i>S.aureus,</i> <i>L.monocytogenes, E.coli,</i> <i>P.aeruginosa.</i></p> <p>Néolignane</p>
 <p><b>Néolignane</b></p>	<p><b>Bactéries</b></p>	<p>Différentes souches de</p> <p><i>Mycobacterium tuberculosis.</i></p>

### Chapitre 3. Présentation de la plante *Globularia Alypum* L.

#### 1. Nom vernaculaires

**Arabe :** *Globularia alypum* appelée communément «Tasselgha», « Chebra », « Chelr'a », « Zerga », « zeriga », « zouitna », « alk », « haselra », « oulbarda » (**Chograni et al., 2013**). Au Maroc elle est appelée Einlarneb (**Jouad et al., 2002**).

**Français :** Globulaire turbith, Séné de Provence, Herbe terrible.

#### 2. Description botanique

Les plantes du genre *Globularia* sont vivaces arbustes très rameux, d'environ 30-60 cm d'hauteur, les tiges sont érigées, brun-rouge striées, à petites feuilles alternes, coriaces, persistantes, glauques, de forme ovale, atténuées à la base en un court pétiole plus ou moins cunéiformes, spatulées. (**Leporatti et Ghedira., 2009**). Dont les fleurs sont groupées en capitules plus ou moins globuleux entourés de bractées. Les fleurs ont une corolle à deux lèvres, la supérieure bilobée souvent atrophiée, l'inférieure trilobée. Elles sont en général bleues, à quatre étamines, fruits en forme d'akènes (**Baba Aissa., 2011**). (**Figure 19**).



**Figure 19 .** *Globularia alypum* L. (originale, prise le 08 avril 2016 à Oued Morra, Laghouat)

**3. Classification : selon (Quezel et Santa., 1963)**

<b>Règne :</b>	<b>Plantae</b>
<b>Sous-règne :</b>	<b>Tracheobionta</b>
<b>Superdivision :</b>	<b>Spermaphyta</b>
<b>Division :</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>Classe :</b>	<b>Magnoliopsida</b>
<b>Sous-classe :</b>	<b>Asteridae</b>
<b>Ordre :</b>	<b>Scrophulariales</b>
<b>Famille :</b>	<b>Globulariaceae</b>
<b>Genre :</b>	<b><i>Globularia</i></b>
<b>Espèce :</b>	<b><i>Globularia alypum</i> L.</b>



**Figure 20 .** La classification de l'espèce *Globularia alypum* L.

**4. Habitat et répartition géographique**

*Globularia alypum* L. de nom local « Tasselgha », est une plante vivace originaire du sud de l'Europe sur le pourtour méditerranéen jusqu'en Grèce, d'Afrique du nord (Algérie, Maroc jusqu'au Sahara) et d'Asie (Egypte, Arabie) est répartie en forêts, dans les terrains rocaillieux, broussailleux et secs (Quezel et Santa., 1963). La répartition mondiale de cette plante est représentée dans la **Figure 21.** (<https://www.gbif.org/species/7703240>).



**Figure 21 .** Répartition mondiale de la plante *Globularia alypum L.*

## 5. Phytochimie et propriétés biologiques

Cette plante est connue pour ses utilisations dans le traitement de l'hypoglycémie, rhumatismale, maladies de l'estomac et infectieuses (Djeridane *et al.*, 2006). De plus, ses feuilles sont souvent utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète, des maladies rénales et cardiovasculaires, de la goutte, de la typhoïde et de la fièvre intermittente (Fehri *et al.*, 2012). 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 (Jouad *et al.*, 2002; Es-safi *et al.*, 2005).

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 composés ont été isolés et caractérisés de genre *Globularia*. Ces composés sont essentiellement des flavonoïdes, des polyphénols, des tannins, des anthocyanines (Khelifi *et al.*, 2011 ; Boussoualim.,2014). La présence de globularine, de résine, de mucilages, de tanins, de choline, de chlorophylle, d'acide-cinnamique, d'acide globularique a été démontrées (Chograni *et al.*, 2013 ;Kada.,2018) .

## 6. Travaux antérieurs

Cette plante représente un potentiel important en métabolites et en activité et jusqu'à présent, la recherche de nouvelles activités biologiques sont en cours. Le Tableau 4 montre quelques travaux antérieurs de cette plante.

**Tableau 4 .** Travaux antérieurs consacrés à l'étude de la plante *Globularia alypum* L.

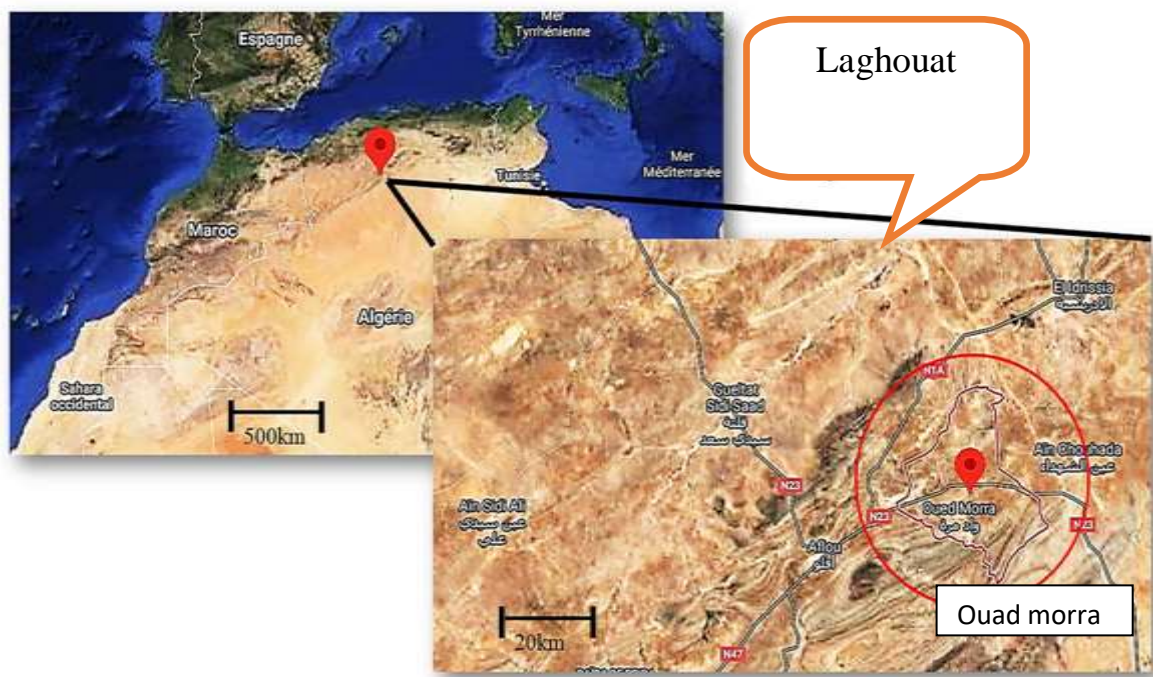
Activités étudiées	Molécules bioactives isolées ou extraits	Références
<b>Antioxydante</b>	<p><i>6-hydroxyluteolin 7-O-laminaribioside.</i></p> <p><i>eriodictyol 7-O-sophoroside,</i></p> <p><i>6'-O-coumaroyl-1'-O-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]-β-D-glucopyranoside.</i></p> <p><i>acteoside, isoacteoside and forsythiaside)</i></p> <p><i>6-hydroxyluteolin 7-O-β-D-glucopyranoside</i></p> <p><i>luteolin 7-O-sophoroside</i></p>	Es-Safi <i>et al.</i> , 2012
<b>Antioxydante</b>	Extraits hydro-alcoolique	Ben Mansour <i>et al.</i> , 2012. Khlifi <i>et al.</i> , 2005. Touaibia <i>et al.</i> , 2016
<b>Antidiabétique <i>in vivo</i></b>	<i>Globularine</i>	Zerriouh Meriem., 2008
<b>Antibactériennes</b>	Extraits hydro-alcoolique	Taghzouti <i>et al.</i> , 2016 Krimat <i>et al.</i> , 2014
<b>Inhibition enzymatique de la xanthine oxydase</b>	Extrait brut	Boussoualim Naouel <i>et al.</i> , 2016
<b>Anti-inflammatoire,</b> <b>Inhibition enzymatique des β-lactamases</b>	Extraits aqueux  Extraits méthanoliques	Kada Seoussen., 2018
<b>Antigénotoxiques</b>	Extraits hydroalcooliques	Harzallah <i>et al.</i> , 2010

# **Matériel & Méthodes**

## Partie Matériel et Méthodes

### 1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne de la plante *Globularia alypum* L., qui a été récoltée dans la région d'Oued Morra Wilaya de Laghouat durant le moi d'avril 2015. Après séchage à une température ambiante et à l'abri de la lumière, le matériel végétal est finement réduit en poudre et conservé dans des flacons en verre hermétiquement fermés jusqu'à utilisation.



**Figure 22 .** Carte géographique représentant les régions de récoltes. (Google maps)

Les données géographiques de la plante étudiée sont mentionnées dans le Tableau 5.

**Tableau 5 .** Les données géographiques de la région de collecte

Partie utilisée	La région de collecte	Longitude	Latitude	Altitude
Parti aérienne	Oued Morra	02°21'04.33"E	1122 m	34°07'12.80"N

## **2. Méthodes**

Les plantes aromatiques constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation requière une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés des plantes dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques. A cet effet, Nous avons voulu apporter par la présente étude notre contribution à une meilleure connaissance relative aux activités biologiques et à la composition chimique d'une espèce végétale spontanée *Globularia alypum* L.

Dans cette partie expérimentale, deux axes ont été envisagés : Le premier axe concerne l'étude phytochimique, suivie par la quantification des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes par dosages. Dans le deuxième, nous nous sommes intéressés au pouvoir antioxydant, à l'activité antidiabétique et à l'activité antimicrobienne des extraits de la partie aérienne de cette plante. Pour ce faire, nous avons suivi une démarche expérimentale qui s'articule autour de deux points essentiels :

Dans un premier temps, un criblage basé sur l'activité antioxydantes et les tests d'inhibition des extraits phénoliques sur l' $\alpha$ - amylase et l' $\alpha$ - glucosidase a été effectué afin de choisir les extraits les plus actives pour d'éventuels étude des activités biologiques (antidiabétiques et antimicrobiennes).

Le résultat de cette première étape a permis de sélectionner trois extraits présentant les meilleures activités et qui feront l'objet de la deuxième étape, qui consiste en l'étude des activités antimicrobienne et antidiabétique.

Notre démarche expérimentale est résumée à travers le schéma suivant (**Figure 23**).

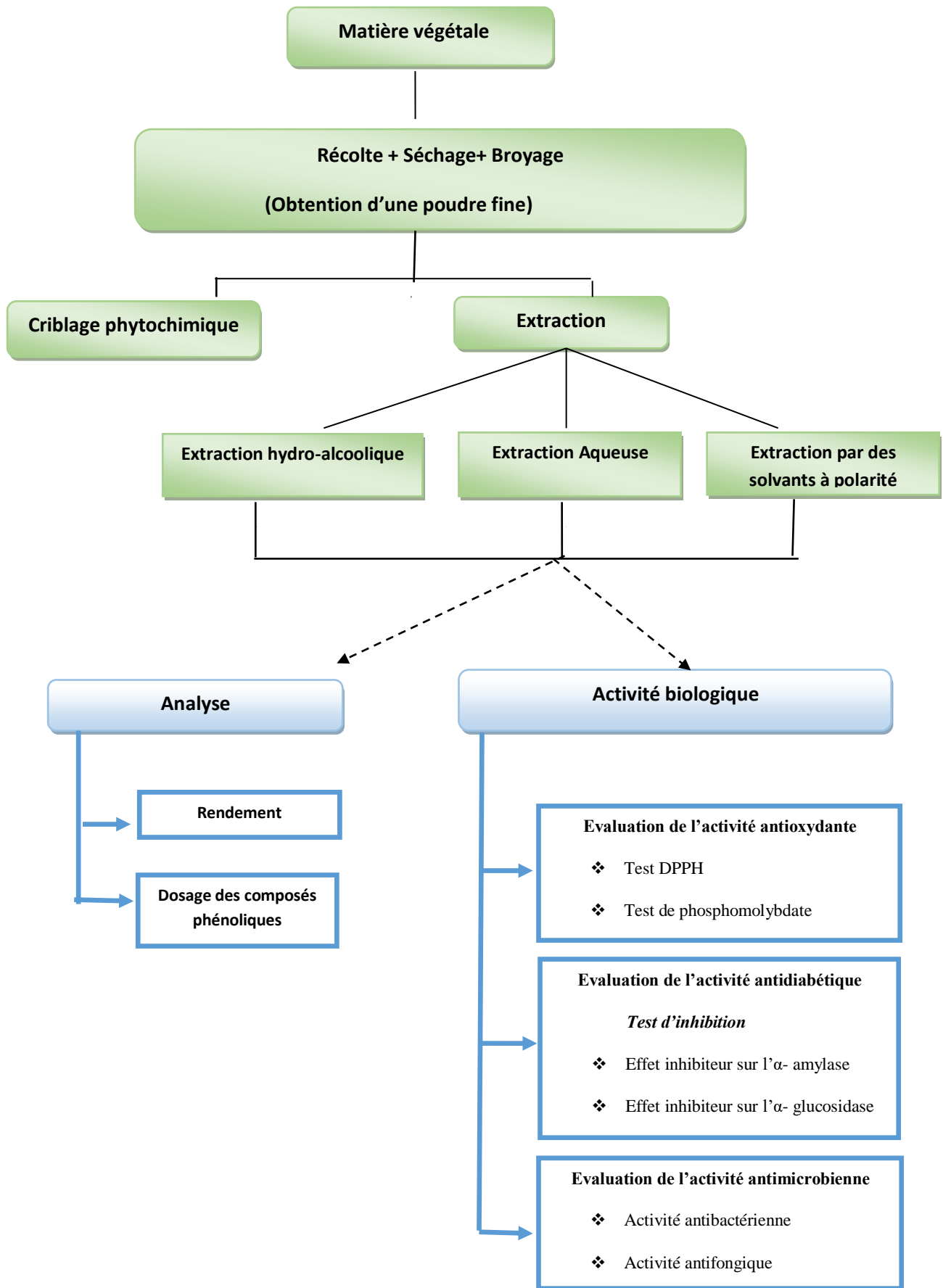


Figure 23 . Plan général de la partie expérimentale

## Chapitre 1 : Préparation et quantification des extraits phénoliques

### 1. Screening phytochimiques

Les tests phytochimiques ont été effectués sur la partie aérienne de la plante *Globularia alypum* L. La détection de certains composés est réalisée en utilisant des méthodes décrites par (Quettier-Deleu., 2000 ; Mojab *et al.*, 2003 ).

#### ➤ Tanins

Une masse de 2 g de la poudre végétale (partie aérienne), a été macérée dans 50 ml d'éthanol à 50 % pendant 24H. Après filtration, quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> 1 % ont été ajoutées à 2 ml du filtrat.

L'apparition d'une couleur vert foncé indique la présence des tanins.

#### ➤ Flavonoïdes

Une masse de 2 g de la poudre végétale, a été macérée dans le méthanol à 80 % pendant 24H, après filtration 2ml d'AlCl<sub>3</sub> 2 % ont été ajoutés à 1ml du filtrat. L'apparition d'une couleur jaune foncé indique la présence de flavonoïdes.

#### ➤ Saponines

Une masse de 2g de la poudre végétale a été chauffée dans 40 ml d'eau distillée jusqu'à l'ébullition, après refroidissement, le mélange a été filtré et vigoureusement agité.

L'apparition de mousses stables après 15 min indique la présence des saponines.

#### ➤ Stérols et triterpènes

Une masse de 2 g de la poudre végétale, a été macérée dans un volume d'éthanol 70% pendant 24H. Après filtration et évaporation à sec le résidu obtenu a été dissout dans 20 ml de chloroforme.

#### ▪ Réaction de Liebermann Buchard

10 ml de la solution précédemment préparée a été évaporé à sec, le résidu obtenu a été dissout dans 5 ml d'anhydride acétique puis 5 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette 1 ml d'acide sulfurique concentré (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a été ajouté au fond du tube sans agiter. Après 30 minutes, la formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et

une coloration violette de la couche surnageante révèlent la présence de stérols et triterpènes.

- **Test de Salwaski**

Un volume égal d'acide sulfurique est ajouté à la deuxième partie du filtrat, l'apparition de la couleur jaune puis leur transformation en rouge indique la présence des tritérènes.

- **Alcaloïdes**

Une masse de 2g de la poudre végétale a été macérée dans 50 ml d'acide chlorhydrique 1% pendant une nuit. Après filtration, on ajoute de l'ammoniac afin d'alcaliser le filtrat. Une extraction liquide-liquide avec du chloroforme est réalisée (trois fois). La phase organique est récupérée puis évaporée sous pression réduite à sec à une température de 55°C. Ce résidu sec est solubilisé dans 2 ml d'acide chlorhydrique (HCl 1%) en ajoutant par la suite quelques gouttes de réactif de Mayer.

L'apparition d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes.

- **Cardénolides**

- **Test de Keller Kiliani**

Une masse de 2 g de la poudre végétale a été macérée dans 20ml d'eau distillée après le mélange soit filtré. Nous avons prélevé 10 ml du filtrat. Celui-ci a ensuite été extrait avec un mélange de 10 ml (chloroforme +éthanol). La phase organique est évaporée sous pression réduite à sec. Le résidu sec est solubilisé dans 3ml d'acide acétique glacial, puis transférer dans un tube à essai. En ajoutant par la suite (2 à 3) gouttes de chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) puis 1ml d'acide sulfurique concentré sur la paroi du tube.

L'apparition d'une couleur bleu-vert dans la phase acide indique la présence des cardinolides.

### ➤ Coumarines

Dans un erlen, on introduit 2 g de la poudre végétale, 16 ml d'éthanol et 2 ml de l'eau distillée. Après filtration, 0,5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25 % ont été ajoutés à 2 ml du filtrat. La présence des coumarines est révélée par l'observation de la fluorescence sous une lampe UV à 366 nm.

Une fluorescence intense dans le tube dont l'ammoniaque a été ajoutée indique la présence des coumarines.

## 2. Préparation des extraits polyphénoliques

### A. Extraction hydro-alcoolique

Dans la présente étude, l'extraction a été réalisée selon le protocole décrit par Amiot et ses collègues (**Amiot *et al.*, 1986**), avec de légères modifications.

Une quantité de 5 g du matériel végétal est macérée dans un mélange hydro-alcoolique méthanol / eau (80/20 : v/v) pendant 72 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps. Après filtration et évaporation sous pression réduite à une température de 45°C, la phase aqueuse de chaque extrait est lavée une ou plusieurs fois avec un demi-volume de l'éther de pétrole dans une ampoule à décanter afin d'éliminer toutes traces de composés apolaires (pigments, lipides, etc.).

La phase aqueuse ainsi obtenue est épuisée successivement par l'acétate d'éthyle et le butanol ce qui nous a permis d'avoir des fractions à priorité contiennent les composés phénoliques polaires. Les fractions organiques obtenues sont séchées par du sulfate de sodium anhydre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  pour éliminer toutes traces d'eau. Après filtration, les solvants sont évaporés à sec sous pression réduite à 50°C. Les résidus secs sont repris dans 10 ml de méthanol pur et conservés à +4°C jusqu'à leur analyse.

### B. Extraction aqueuse

L'extrait aqueux de la plante est préparé selon **Khecheba *et al.* (2014)**. Brièvement, 5g de la poudre végétale est macéré dans 100ml d'eau distillée à 75°C pendant 20 minutes, après filtration et évaporation de l'eau à pression réduite à 50°C, le résidu est pesé et solubilisé dans l'eau distillée puis conservé sous une température de 4°C jusqu'à leur analyse.

### C. Extraction par des solvants à polarité croissante

L'extraction a été réalisée selon le protocole décrit par Loh Su Peng (**Loh et Hadira, 2011**), avec de légères modifications.

Une quantité de 5 g de la poudre végétal est macérée dans 100 ml d'hexane dans l'obscurité à température ambiante pendant 48H. L'opération a été répétée plusieurs fois jusqu'à l'épuisement du matériel végétal. Après filtration la phase résiduelle obtenue a été reprise pour une succession de macérations avec un même volume de dichlorométhane, l'acétate d'éthyle ; éthanol et méthanol comme décrit précédemment jusqu'à épuisement.

Après filtration, les extraits organiques ainsi obtenus sont évaporés à sec sous pression réduite à 45°C. Les résidus secs sont repris dans 10 ml de méthanol et conservé au réfrigérateur jusqu' à leur analyse.

### 3. Calcul de rendement

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

**M** : Masse en gramme de l'extrait sec résultant après l'évaporation.

**M<sub>0</sub>** : Masse en gramme du matériel végétal sèche en poudre.

### 4. Dosage et quantification des composées phénoliques

#### 4.1- Dosage des polyphénols totaux

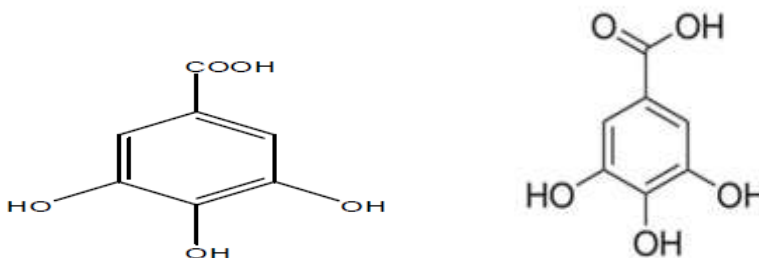
Les polyphénols produits par les végétaux en tant que métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules chimiques, dont leur nature chimique et teneur sont extrêmement variables d'une espèce à autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin–Ciocalteu est la plus utilisée (**Portes., 2008**).

### a) Principe

Le principe de ce dosage est adapté par Singleton et Ross (en 1965) avec le réactif de Folin –Ciocalteu (**Giner-Chavez., 1996**).

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune, constitué d'acide phosphotungestique  $H_3PMO_{12}O_{40}$  et d'acide phosphomolybdique  $H_3PW_{12}O_{40}$  qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite, dont l'absorption maximale est à 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux.

La quantification des polyphénols totaux a été faite à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisée dans les mêmes conditions que celles de l'échantillon, en utilisant l'acide gallique comme standard (**Figure 24**). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalents de l'acide gallique par gramme de matière végétale sèche et en poudre (mg EAG/g MS).



**Figure 24 .** Structure de l'acide gallique

### b) Procédure expérimentale

Des solutions méthanoliques de différentes concentrations d'extrait (ou d'étalon) ont été préparées. 100  $\mu$ l de chaque solution diluée ont été mélangés avec 500  $\mu$ l de réactif de Folin- Ciocalteu (dilué dix fois). Après deux minutes, on ajoute 2 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 2% (m/v), le mélange a été incubé à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution préparée est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de type *Shimadzu 1601*, à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc ne contenant pas d'acide gallique. Les valeurs d'absorbance de chaque solution ainsi préparée nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et de doser les phénols totaux dans les extraits végétaux.

L'équation de régression déduite de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique nous permet de déterminer la teneur en phénols totaux exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG /g MS). Tous les essais ont été reproduits trois fois.

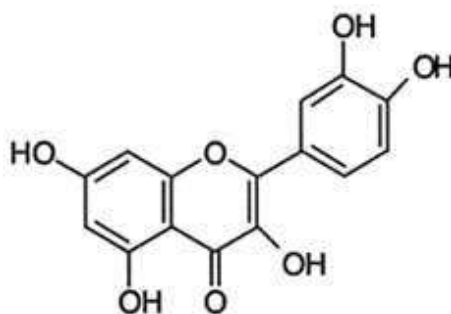
## 4.2. Dosage des flavonoïdes

### a) Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Lamaison et Carnat (1991) (**Djeridane et al., 2006**), en utilisant le trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) comme réactif.

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe acide stable soit avec le carbonyle ( $\text{C}=\text{O}$ ) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. En plus, il forme des complexes acides labiles avec les groupements dihydroxyyles en ortho du cycle A ou B des flavonoïdes (**Chang et al., 2002**). Ce complexe est de coloration jaune absorbe fortement à une longueur d'onde de 430 nm.

Afin de quantifier les teneurs en flavonoïdes dans nos extraits, un flavonol standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage est la quercétine.



**Figure 25** . Structure de quercétine

**b) Procédure expérimentale**

A partir d'une solution étalon méthanolique de la quercétine, une gamme des solutions diluées a été préparée en milieu aqueux pour établir la courbe d'étalonnage.

1 ml de chaque solution diluée ou de l'extrait végétal dilué est mélangé avec 1 ml de trichlorure d'aluminium à 2% (dans du méthanol). Ces solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution préparée a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre de *Shimadzu 1601* à une longueur d'onde de 409 nm contre un blanc. Les valeurs de l'absorbance ainsi obtenues ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de la quercétine et de déterminer les flavones et les flavonols dans les extraits végétaux.

La concentration en flavonoïdes dans chaque extrait est déterminée suite à l'équation de régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg Eq Q/g M.S). Chaque expérience est répétée 3 fois.

**Etude statistique**

Les analyses de la variance ont été réalisées par le logiciel statistique Microsoft office Excel 2013. Toutes les expériences ont été faites en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type (n=3) pour chaque cas.

## Chapitre 2 : Activités biologiques

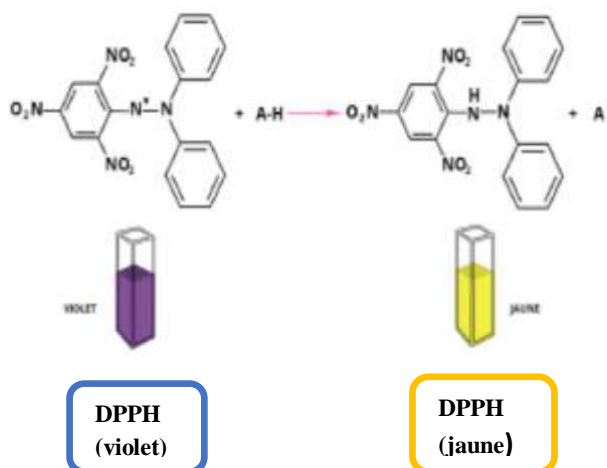
### 1. Evaluation de l'activité antioxydante

Deux tests ont été utilisés pour évaluer la capacité antioxydante *in vitro* des extraits phénoliques issue des trois méthodes d'extraction. Dans ce travail, il s'agit du pouvoir piégeur du radical DPPH<sup>+</sup> et du test de phosphomolybdate. Cette première étape constitue un tri préliminaire pour déceler les extraits phénoliques à forte activité antioxydante. Ces extraits font par la suite, dans la deuxième étape, l'objet d'une étude de l'activité antimicrobienne et antidiabétique.

#### A. Test de DPPH :

##### ➤ Principe de la méthode

La molécule de 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>·</sup>) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH<sup>·</sup> est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène, antioxydante, la forme réduite du radical est générée et accompagnée d'une perte de couleur (Raquibul *et al.*, 2009) ; (Figure 26).



**Figure 26 .** Structure chimique du radical DPPH<sup>·</sup> et de sa forme réduite

##### ➤ Procédure expérimentale

Pour la mesure de cette activité antiradicalaire, une prise d'essai de 500 µl de chaque extrait phénolique de concentration croissante a été additionnée à 500 µl d'une solution de

DPPH<sup>·</sup> (250 µM) préparée dans le méthanol. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, les absorbances des échantillons ont été mesurées à 517 nm par un spectrophotomètre UV Visible de type *Shimadzu 1601* contre un témoin négatif (sans extrait). La quercétine, l'acide gallique et la Vitamine C pris comme d'antioxydant de référence afin de référencer l'activité de nos extraits.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule ci-dessous :

$$I \% = [(Abs\ contrôle - Abs\ extrait) / Abs\ contrôle] \times 100$$

Où

A contrôle : désigne l'absorbance de la solution de DPPH<sup>·</sup> seul à 517 nm ;

A extrait : désigne l'absorbance du DPPH<sup>·</sup> en présence de l'extrait testé à 517 nm.

La concentration efficace (EC<sub>50</sub>) qui est la concentration d'extrait ou de l'antioxydant de référence responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH<sup>·</sup> présents dans le milieu réactionnel, est déterminée sur le graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH<sup>·</sup> en fonction des concentrations des extraits ou des antioxydants de référence.

## B. Test de phosphomolybdate

### ➤ Principe de la méthode

Ce test est basé sur la réduction de Molybdate(VI) en Molybdate(V), en présence des composés antioxydants en raison de la présence de groupes donneurs d'électrons tels que les groupes hydroxy et le groupe méthoxy à l'anneau de phényle substitué. et la formation subséquente d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V)) à un pH acide. La diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) est mesurée par spectrométrie UV Visible à une longueur d'onde de 695 nm. (Naik *et al.*, 2013).

### ➤ Procédure expérimentale

La méthode consiste à introduire dans un tube 200 µl de chaque extrait à différentes concentrations (dilués dans méthanol) sont mélangés avec 2 ml du réactif phosphomolybdate composé d'un mélange de solutions : acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,6 M), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (28 mM) et molybdate (4 mM). Le mélange a ensuite été incubé dans un bain-marie réglé à 95°C pendant 90 min (Prieto *et al.*, 1999). Les absorbances ont été

déterminées à 695 nm contre un blanc. La même procédure expérimentale est réalisée avec des solutions d'acide gallique et de quercétine prises comme standards pour des raisons de comparaison et de vitamine C pour référer les résultats en calculant le paramètre VCEAC.

Les étalons, les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent vitamine C par gramme de matière sèche de l'extrait (mg EAA/g EXS).

## 2. Evaluation de l'activité antidiabétique

L'une des approches thérapeutiques consiste à diminuer l'hyperglycémie postprandiale en retardant l'absorption du glucose par l'inhibition des enzymes qui hydrolysent les carbohydrates dans l'intestin, à savoir l' $\alpha$  - amylase et l' $\alpha$  - glucosidase (Wang *et al.*, 2016). Celles-ci sont des cibles importantes pour découvrir de nouveaux agents pour le traitement du diabète de type II.

Les polyphénols végétaux jouent un rôle très important dans l'inhibition de l'activité des enzymes digestifs comme l' $\alpha$  - amylase, l' $\alpha$  - glucosidase, la pepsine, la trypsine et les lipases. Ces substances ont un effet régulateur sur l'absorption intestinale du glucose, (Chethan *et al.*, 2008).

Dans ce concept nous avons procédé à l'étude de l'effet de nos extraits phénoliques sur les deux types d'hydrolases responsables du processus digestif des hydrates de carbone à savoir l' $\alpha$  - amylase et de l' $\alpha$  - glucosides, afin de tester leurs activité antidiabétique.

### 2.1. Evaluation de l'activité inhibitrice sur l' $\alpha$ -amylase

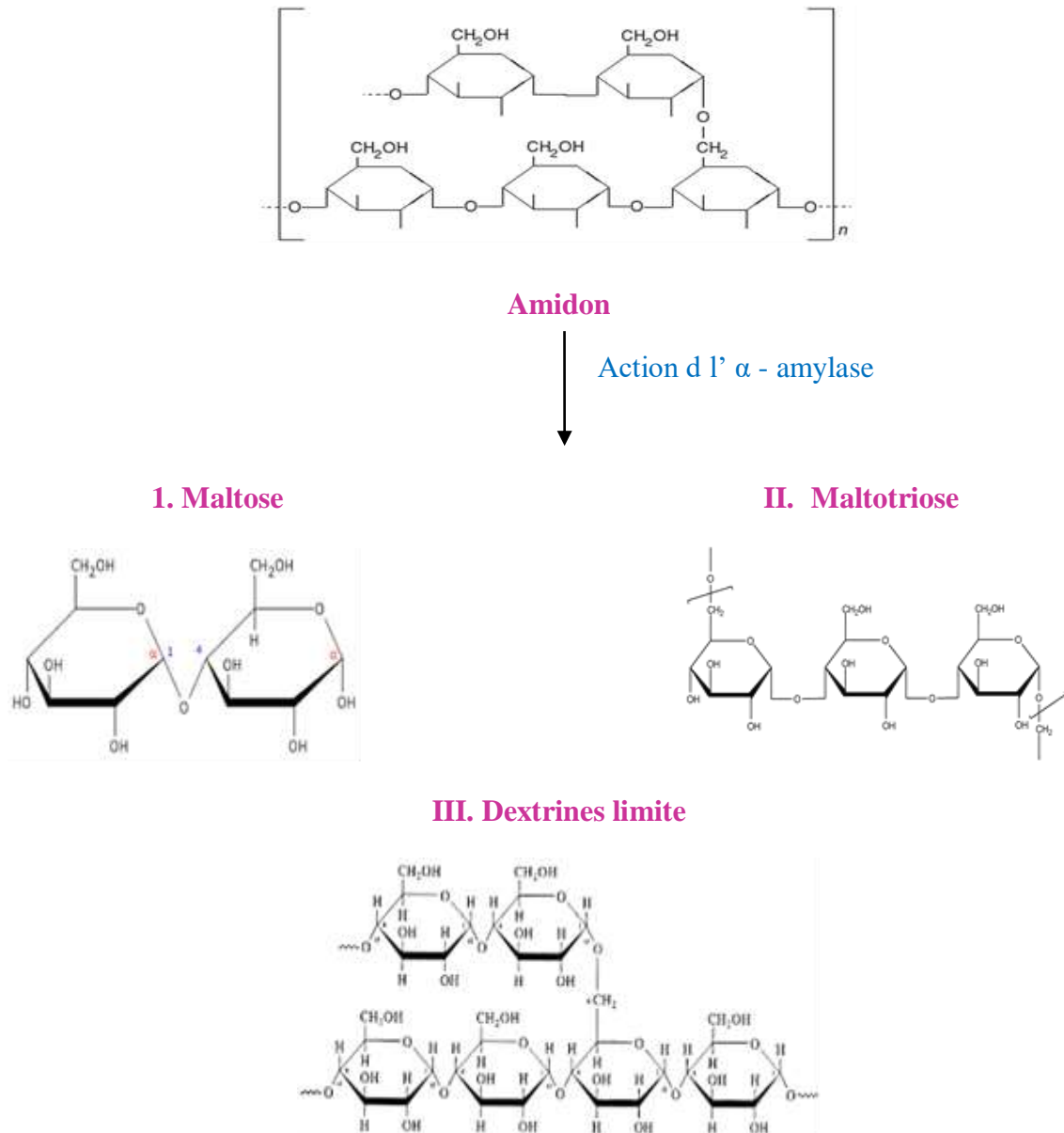
Plusieurs composés phénoliques sont doués d'une activité inhibitrice de l' $\alpha$ - amylase. Ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été faits pour identifier des inhibiteurs efficaces de l' $\alpha$ - amylase à partir de ressources naturelles afin de développer de nouveaux composés antidiabétiques pour le traitement du diabète (Kumar *et al.*, 2011).

Les  $\alpha$ -amylases ont la capacité d'hydrolyser les liaisons de types  $\alpha$ -(1,4) à l'intérieur des chaînes d'amidon (Lévêque *et al.*, 2000).

Dans notre étude, la mesure de l'activité enzymatique d' $\alpha$ -amylase fongique d'*Aspergillus oryzae* revient à un dosage spectrophotométrique indirect du produit libéré lors de l'hydrolyse du substrat, dans des conditions de température et de PH favorable.

### A. Principe de la méthode de dosage par DNS

L'activité enzymatique de l' $\alpha$  - amylase est dosée sur son substrat l'amidon. Elle catalyse l'hydrolyse de ce substrat qui libère le maltose et d'autres produits (**Figure 27**). Le maltose libéré est dosé spectrophotométriquement en donnant une coloration jaune-orangé. Cette coloration est mesurable à 540 nm et son intensité est proportionnelle à la quantité du produit libéré.



**Figure 27 .** Produits de dégradation de l'amidon par l' $\alpha$  – amylase

Cette méthode teste la présence d'un groupe carbonyle libre (C = O) des sucres dits réducteurs. Ceci implique l'oxydation du groupe fonctionnel présent dans le glucose, Simultanément, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) est réduit en acide 5-nitrosalicylique 3-amino dans des conditions alcalines.

La méthode est basée sur le pouvoir réducteur des groupes aldéhydes et cétones libres des sucres. En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation de ces fonctions provoque simultanément la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique jaune orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orange absorbant à une longueur d'onde de 540 nm. L'intensité de la coloration varie selon la quantité du produit libéré (sucres réducteurs) présents dans le milieu réactionnel (**Khacheba., 2014 ; Alexis et Joachim., 2016**).

Le maltose libéré dans le milieu réactionnel réagit avec le DNS en donnant un complexe jaune orangé dont l'absorption maximale est mesurée à 540 nm.

Chaque molécule de maltose (une liaison hydrolysée) libérée dans le milieu réactionnel, réagit avec le DNS en excès de couleur orange entraînant une réduction de ce dernier, induisant en parallèle un changement de couleur vers le rouge brique dont l'intensité mesurée après dilution à 540 nm est proportionnelle à la quantité de maltose.

## **B. Test d'inhibition**

Avant de procéder à l'étude de l'activité inhibitrice de nos extraits phénoliques, vis-à-vis de l'alpha amylase, nous les avons soumis des tests d'inhibition question de juger leur potentiel inhibiteur envers l'alpha amylase, c'est-à-dire l'étude de leur comportement sur l'activité enzymatique (augmentation ou diminution) et quel pourcentage d'inhibition ils pouvaient atteindre.

Le test d'inhibition enzymatique de l'alpha-amylase utilisé au notre laboratoire est basé sur celui décrit par **Khachba** et ses **collaborateurs (2014)**, en y apportant quelques modifications.

Dans des tubes à essai les milieux réactionnels contenaient 100µl d'amidon et 100 µl de chaque extrait phénolique dilué à la même concentration dans un tampon phosphate salé (PH=6.9). Les tubes sont ensuite incubés pendant 5 minutes à 37°C, ensuite 100 µl d'α - amylase (13 U/ml), sont ajoutés pour débiter la réaction. Après 5 min d'incubation la réaction enzymatique est stoppée par l'ajout d'1ml de DNS, le milieu réactionnel est ensuite porté à l'ébullition à 100 °C pendant 5 minutes, après refroidissement le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau distillée. Les absorbances ont ensuite été mesurées à 540 nm avec un spectrophotomètre. Un contrôle a été préparé de la même façon sans inhibiteur et incubé pendant 10 min à 37°C.

Les pourcentages d'inhibition sont calculés selon la relation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon du test}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$  : Densité optique du contrôle ou témoin.

$A_{\text{échantillon du test}}$  : Densité optique de l'échantillon avec inhibiteur du test.

### C. Etude du pouvoir anti-amylasique

L'activité inhibitrice confirmée par le test précédant, nous a encouragé à procéder à l'étude de l'activité anti – amylasique des trois extraits (aqueux, acétate d'éthyle et le butanol) qui ont montré une bonne inhibition, en vue de déterminer pour chaque extrait le paramètre IC<sub>50</sub>.

La concentration inhibitrice (IC<sub>50</sub>), est une mesure quantitative de l'efficacité d'un composé à inhiber d'une fonction biologique ou biochimique spécifique. Cette mesure indique quelle quantité de cette substance inhibitrice est nécessaire pour inhiber à moitié un processus biologique donné (ou un élément d'un processus, par exemple une enzyme cellulaire, un récepteur des cellules ou micro-organismes) (Pham., 2016).

Dans notre étude la valeur de l'IC<sub>50</sub> représente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse réactionnelle jusqu'à 50% de sa valeur maximale non – inhibée. Cependant une valeur d'IC<sub>50</sub> seule ne permet pas de tirer des conclusions mécanistiques, mais peut être utilisée comme un indice de l'efficacité de l'inhibition par rapport à d'autres inhibiteurs si les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont déterminées dans les mêmes conditions réactionnelles (Keillor., 2004).

Pour cela, nous avons varié la concentration en extraits phénoliques. L'activité inhibitrice des extraits est mesurée comme décrit précédemment en introduisant 100 µl des différentes concentrations variables d'extraits phénoliques.

La représentation graphique de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en extraits phénoliques, permet de déterminer les valeurs d'IC<sub>50</sub> pour chaque extrait.

## 2.2. Evaluation de l'activité inhibitrice sur L' $\alpha$ – glucosidase

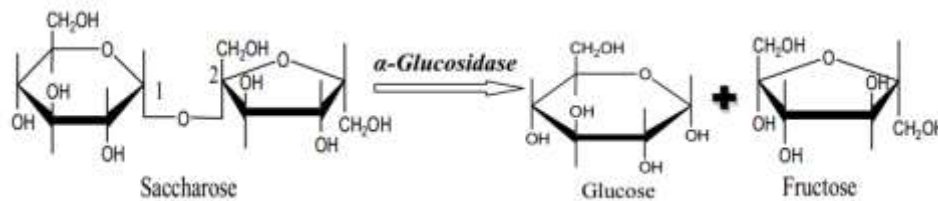
Les  $\alpha$ -glucosidases sont des enzymes présentes dans la bordure en brosse de l'intestin et elles libèrent le glucose à partir des disaccharides que l'organisme sera ensuite capable de l'absorber et l'utiliser. Les  $\alpha$ -glucosidases sont des enzymes qui interviennent dans l'hydrolyse des saccharides (poly-, oligo- et disaccharides) en monosaccharides, à l'exception du lactose. Les monosaccharides sont les seuls à pouvoir être absorbés par l'organisme. Ils jouent un rôle essentiel dans la digestion des glucides et la biosynthèse des glycoprotéines (Chaib., 2018).

Dans cette étude, nous avons procédé à l'étude de l'effet des extraits phénoliques de l'espèce *Globularia alypum* L. sur l' $\alpha$ -glucosidase de levure (EC 3.2.1.20), en s'intéressant à l'évaluation des capacités des molécules phénoliques de nos extraits à inhiber son activité catalytique.

Dans le cas de cette enzyme la mesure de l'activité enzymatique revient à un dosage spectrophotométrique indirect du sucre réducteur (glucose) libéré dans le milieu réactionnel lors de l'hydrolyse du substrat (saccharose), dans des conditions de température et de pH favorables (37°C et pH= 6,9).

### A. Principe de la méthode

L'activité enzymatique de l' $\alpha$ -glucosidase est dosée sur son substrat le saccharose (un sucre double (diholoside)) formé par la condensation de 2 oses : une molécule de glucose et une molécule de fructose. Elle catalyse l'hydrolyse de ce substrat qui libère du glucose (aldohexose) et du fructose (cétose). Le glucose libéré est dosé spectrophotométriquement (Khacheba., 2014).

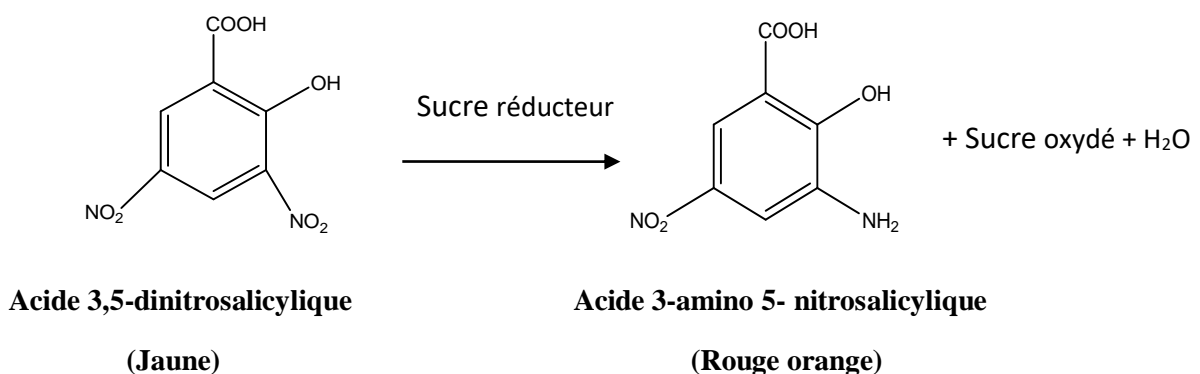


**Figure 28 .** Produits de dégradation du saccharose par l' $\alpha$  – glucosidase

La méthode suivie est celle de **Bernfeld (1955)**, elle est basée sur le dinitrosalicylique DNS qui stoppe la réaction enzymatique par un changement de pH et forme un complexe avec le glucose.

Cette méthode teste la présence d'un groupe carbonyle libre ( $C = O$ ) des sucres dits réducteurs. Ceci implique l'oxydation du groupe fonctionnel présent dans le glucose, Simultanément, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) est réduit en acide 5-nitrosalicylique 3-amino dans des conditions alcalines ou le groupe aldéhyde est oxydé en acide adonique.

Chaque molécule de glucose (une liaison hydrolysée) libérée dans le milieu réactionnel, réagit avec le réactif DNS (3,5-dinitro-salicylate), développant une coloration rouge-orange mesurable à 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de produit libéré dans le milieu réactionnel.



**Figure 29 .** La réaction du réactif DNS avec un sucre réducteur

## B. Test d'inhibition

Avant de procéder à l'étude de l'activité inhibitrice de nos extraits phénoliques, vis-à-vis de l' $\alpha$ -glucosidase, nous les avons soumis à des tests d'inhibition question de juger leur potentiel inhibiteur envers de l' $\alpha$ -glucosidase, c'est-à-dire l'étude de leur comportement sur l'activité enzymatique (augmentation ou diminution) et quel pourcentage d'inhibition ils pouvaient atteindre.

Dans des tubes à essai les milieux réactionnels contenaient 1 ml de substrat (saccharose) et 100  $\mu$ l de chaque extrait phénolique dilué dans un tampon phosphate salé (PH=6.9) à la même concentration que celle du test d'inhibition pour l' $\alpha$ -amylase pour des raisons de comparaison.

Les tubes sont ensuite incubés pendant 10 min à 37°C, ensuite la réaction enzymatique est débutée par l'ajout de 100  $\mu$ l de l'enzyme (2U/ml). Après 30 min de déroulement de la réaction, 1ml de DNS est ajouté pour stopper la réaction. Le milieu réactionnel est porté à ébullition pendant 10 minutes, après refroidissement, 1 ml d'eau distillée a été ajouté. La lecture d'absorbance à 540 nm ont été comparées à un contrôle qui avait comme composition, 100 $\mu$ l de tampon phosphate (pH=7) à la place de l'extrait (réaction sans inhibiteur), Les pourcentages d'inhibition sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon du test}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

**A<sub>contrôle</sub>** : Absorbance du control en absence de l'extrait végétal.

**A<sub>échantillon du test</sub>** : Absorbance d'échantillon du test.

### C. Etude du pouvoir anti- glucosidique

L'activité inhibitrice confirmée par le test président, nous a encouragés de procéder à l'étude de l'activité anti- glucosidique des trois extraits (aqueux, acétate d'éthyle et le butanol) qui ont montré une très bonne inhibition, en vue de déterminer le paramètre IC<sub>50</sub> pour chaque extrait.

Pour cela nous avons varié les concentrations des extraits phénoliques. L'activité inhibitrice des extraits est mesurée comme décrit précédemment en introduisant 100 µl des différentes concentrations variables d'extraits phénoliques.

La représentation graphique de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques, nous permet de déterminer les valeurs de la CI<sub>50</sub> pour chaque extrait.

### 3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Suite aux résultats d'activité antioxydante, et l'effet d'inhibition de nos extraits phénoliques sur les deux types d'hydrolases  $\alpha$  – amylase et  $\alpha$  – glucosidase , notre étude s'est focalisée sur les trois extraits qui prouvé leur forte activité inhibitrice et pouvoir antioxydant ( acétate d'éthyle, butanol et l'extrait aqueux), La mise en évidence du l'activité antimicrobienne de ces extraits, a été réalisée par des tests chimiques *in vitro* pour évaluer l'activité antibactérienne et antifongique .

#### 3.1. Souches microbiennes

Les microorganismes utilisés pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne sont composés de cinq souches bactériennes ont été isolées à partir des fluides biologiques des patients au niveau de laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Laghouat. Les références ATCC (American Type Culture Collection) ont été fournies par le Laboratoire vétérinaire régional de Laghouat (L.R.V.L), et trois souches fongiques ont été fournis et identifiées par le laboratoire de Mycologie du Département de Biologie de l'Université de Tlemcen (L.M.U.T).et trois souches fongiques ont été fournis et identifiées par le laboratoire de Mycologie du Département de Biologie de l'Université de Tlemcen (L.M.U.T).

Les noms des espèces, leurs références ainsi que leur origine sont regroupées dans le Tableau 6.

**Tableau 6 .** Souches microbiennes utilisées lors des tests microbiologiques

Souches	Reference	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	LRVL
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19432	LRVL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	LRVL
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	LRVL
<i>Salmonella typhi</i>	Isoler	LRVL
<i>Aspergillus flavus</i>	Isoler	L.M.U.T
<i>Penicillium spp</i>	Isoler	L.M.U.T
<i>Fusarium oxysporum</i>	Isoler	L.M.U.T

### 3.2. Revivification des espèces pathogènes

La revivification des souches microbiennes est une étape nécessaire avant leur utilisation car leur activité est nulle à l'état conservé. Elle a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure et des colonies bien isolées qui vont servir à préparer l'inoculum.

Pour chaque bactérie, des colonies ont été introduites dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif, à l'aide d'une anse de platine stérile. Les tubes sont ensuite été incubés à 37 C° pendant 24 à 48 heures. Cette étape permet la croissance des bactéries, ce qui facilitera leurs cultures dans les milieux d'isolement (Guiraud., 2003).

Pour cela, les souches microbiennes sont ensemencées par la méthode de stries. Celles-ci sont alors revivifiées à partir des tubes de conservation sur gélose nutritive pour les bactéries et sur milieu PDA (Potatos Dextrose Agar), pour les champignons.

Les cultures sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 24H pour les bactéries et à 27°C pendant 48H pour les champignons.

### 3.3. Repiquage des souches microbiennes

Les souches bactériennes obtenues sont repiquées dans des boîtes de pétries renfermant le milieu Muller-Hanton, par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Cependant, les champignons sont repiqués sur de la gélose PDA (Potatos Dextrose Agar) (**Annexe 5**) et incubé à 27°C durant 6-7 jours. Cette étape permet l'obtention d'une culture jeune et des colonies bien isolées qui vont servir à préparer l'inoculum.

Afin d'ensemencer les milieux de culture, solide et liquide, un disque de gélose de 5mm de diamètre contenant du mycélium a été transféré sur du milieu PDA (Potatos Dextrose Agar) vierge, au centre de chaque boîte, à partir d'une culture pure préparée au préalable. L'incubation a été faite à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , durant 6 jours (**Collin *et al.*, 1991**).

### 3.4. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir de colonies jeunes de bactéries et moisissures dans de l'eau physiologique stérile de sel (NaCl) (0,8%) pour avoir un inoculum de 108 UFC /ml. La densité optique des suspensions a été ajustée de 0.08 à 0.1, lue à 625 nm, ce qui correspond à une densité cellulaire voisine à celle de 0,5 McFarland. On obtient alors des inoculum estimés à 106 à 108 unités formant colonies par millilitre (UFC/ ml).

Il faut noter que pour l'obtention de la suspension 108 germes par ml, l'absorbance à 620 nm doit être comprise entre 0,2 et 0,3.

### 3.5. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits phénoliques choisis a été réalisée *in vitro* par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Valle *et al.*, 2015). Les différentes souches bactériennes sont repiquées par la méthode des stries sur gélose Mueller Hinton, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. A partir de ces cultures jeunes, des colonies pures sont isolées pour préparer l'inoculum bactérien. Une suspension de chaque bactérie est préparée dans de l'eau physiologique stérile à 0,8 % de sel (NaCl) et ajustée jusqu'à l'obtention d'une opacité de Mac Ferland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml). L'ensemencement de l'inoculum est réalisé par écouvillonnage en effectuant des stries serrées sur les surfaces du milieu gélosé Mueller-Hinton (Saffidine., 2015).

Des disques stériles de papier Wattman de 6 mm de diamètre, sont imprégnés chacun de 10µl d'extrait dissoute dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO10%) à différentes concentrations (50, 60, 80 et 100 mg / ml), et les disques de témoin négatif sont imprégnés de 10µl de solvant DMSO. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque extrait.

Tous les disques, une fois séchés dans l'étuve à 37°C, sont déposés délicatement sur le milieu gélosé ensemencé préalablement avec une suspension bactérienne des souches testées. Après 24 H d'incubation à 37°C, nous avons noté l'activité des extraits, en mesurant la zone d'inhibition, claire, autour des disques en mm et les résultats sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues  $\pm$  l'écart type.

#### Expression des résultats

Selon Biyiti *et al.* (2004), un extrait est considéré comme actif s'il produit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm. Une zone d'inhibition supérieure à 14 mm correspond à une activité antibactérienne très significative (Ramzi *et al.*, 2010).

### 3. 6. Détermination de l'activité antifongique

La méthode du contact direct a été appliquée pour évaluer l'activité antifongique des extraits polyphénoliques, par l'évaluation du taux d'inhibition selon la méthode de Fandohan (2004). Une quantité de 500 µl des extraits phénoliques à différentes concentrations (50, 80 et 100 mg / ml) sont incorporés séparément dans des tubes contenant 20 ml du milieu PDA maintenu en surfusion. Chaque tube a été homogénéisé instantanément par agitation manuelle puis son contenu a été coulé dans des boîtes de Pétri en verre de 90 mm (20 ml / boîte). Après solidification de gélose, les boîtes de pétri sont

ensemencées par un disque mycélien, de 6 mm de diamètre pris de la culture jeune du mycète. Le PDA sans extrait a été utilisé comme négatif contrôle pour chaque souche. Chaque essai est répété trois fois.

La lecture des résultats a été effectuées après 7 jours d'incubation à (25±2) °C par mesure du diamètre de la zone de croissance.

### **Expression des résultats**

L'activité antifongique des extraits a été déterminée par la mesure du taux d'inhibition de la croissance en utilisant la formule suivante :

$$PI (\%) = (A - B)/A \times 100,$$

où, PI(%) : Taux d'inhibition exprimé en pourcentage ;

A : diamètre moyen de la croissance mycélienne du témoin (en mm)

B : diamètre moyen de la croissance mycélienne en présence de l'extrait (en mm).

### **Analyse statistique**

Les analyses de la variance ont été réalisées avec le logiciel statistique Microsoft office Excel 2013. Toutes les expériences ont été reproduites au moins trois fois, les résultats ont été présentés par la moyenne de son écart type (n=3) pour chaque cas.

# **Résultats et discussions**

## Partie : Résultats et discussions

### 1. Tests phytochimiques

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de certains types de métabolites secondaires dans notre plante et d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et changements de couleur.

Les résultats obtenus à partir des tests préliminaires pour le criblage phytochimique, réalisés sur la partie aérienne de l'espèce *Globularia alypum* L. sont consignés dans le Tableau 7.

**Tableau 7 .** Résultats des tests phytochimiques de la partie aérienne de l'espèce *Globularia alypum* L.

Teste de	Résultats
<b>Tanins</b>	+++
<b>Flavonoïdes</b>	+++
<b>Saponines</b>	++
<b>Stérols et triterpènes :</b>	
❖ <b>Test de Liebermann Buchard</b>	++
❖ <b>Test de Salwaski</b>	++
<b>Alcaloïdes</b>	-
<b>Cardénolides</b>	+
<b>Coumarines</b>	+

(+++): réaction très positive. (++) : réaction moyennement positive.

(+) : réaction faiblement positive. (-) : réaction négative.

Selon les résultats obtenus par le test phytochimique, nous remarquons la présence de flavonoïdes, tanins, stérols, triterpènes, coumarines, saponosides et sucres réducteurs avec l'absence totale des alcaloïdes.

D'après ces résultats, nous déduisons que notre plante est riche en divers métabolites secondaires, ce qui explique l'intérêt et l'attention particulière portée par les chercheurs, à travers des études scientifiques sur cette plante. (**Harzallah *et al.*, 2010 ; Ben Mansour *et al.*, 2012**).

## **2. Rendement des extraits**

L'extraction des composés phénoliques par les trois méthodes : hydroalcoolique, aqueuse et l'extraction par des solvants à polarité croissante de la plante étudiée, nous a permis de déterminer les valeurs des rendements pour chaque extrait par rapport au poids initial du matériel végétal sec mis en poudre. Les extraits organiques obtenus ayant subi le même traitement d'évaporation et les mêmes conditions de conservation ont présenté le même aspect de couleurs différentes. Les teneurs des extraits, leurs couleurs et leurs aspects sont consignés dans le Tableau 8.

**Tableau 8 .** Teneur, aspect et couleur des extraits organiques de la plante *Globularia alypum* L.

<b>Méthodes d'extraction</b>	<b>Extrait</b>	<b>Aspect</b>	<b>Couleur</b>	<b>Teneur %</b>
<b>Extraction hydroalcoolique</b>	Acétate d'éthyle	Poudreux	Vert-jaune	33
	Butanol	Poudreux	Vert fonce	14
<b>Extraction aqueuse</b>	Aqueux	Visqueux	Marron foncé	<b><u>47</u></b>
<b>Extraction par des solvants à polarité croissante</b>	Dichlorométhane	Visqueux	Vert militaire	5,5
	Acétate d'éthyle	Visqueux	Vert clair	15
	Éthanol	Visqueux	Jaune foncé (doré)	30
	Méthanol	Visqueux	Vert olive	18

Les résultats obtenus montrent que parmi tous les extraits de *Globularia alypum* L., l'extrait aqueux représente le rendement le plus élevé avec un pourcentage de 47 % tandis que le plus faible rendement a été enregistré dans l'extrait dichlorométhane obtenu par la troisième méthode d'extraction 5,5%. Les teneurs d'extractions varient entre 14 et 33 % pour l'extraction hydroalcoolique et entre 5 et 30% pour l'extraction par des solvants à polarité croissante.

Nous avons remarqué aussi que les rendements d'extraction varient entre les différents extraits. Cette différence se distingue également dans un même extrait d'une méthode d'extraction à l'autre. Ceci, revient en fonction de plusieurs paramètres comme des études l'avaient montré, d'une part, de l'influence de la technique d'extraction et d'autre part, de celle du cycle végétatif, ainsi que de la période de récolte et de la localisation géographique. Le temps de séchage de la plante influe également sur le rendement des extraits (**Michel et al., 2011**).

Selon **Vermeris et Nicholson (2006)**, la différence des valeurs peut s'expliquer par la richesse ou la pauvreté de la plante en composés solubles dans les solvants utilisés et peut être liée à leurs degrés de solubilité dans ces derniers et leur degré de glycosylation (**Markham., 1982**).

Si nous comparons les valeurs obtenues entre les trois méthodes d'extraction utilisées dans cette étude, nous pouvons constater que les teneurs enregistrées pour l'extraction aqueuse sont supérieures à celle enregistrées pour les extractions organiques. Ceci peut être attribué à la grande capacité de dissolution de l'eau. En effet, l'eau possède un indice de polarité élevé, une constante diélectrique et une énergie cohésive très élevée par rapport aux autres solvants, ce qui permet une liaison forte entre les molécules d'eau et les composés polaires du soluté provoquant leur dissolution (**Dhanani et al., 2017**).

L'extrait aqueux brut est une matrice de compositions complexes susceptibles de contenir quelques composés différents caractérisés par leurs propriétés physico-chimiques commune : solubilité dans l'eau, polarité. Les familles chimiques sont représentées surtout par les métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes à l'exception de composé apolaires (certains alcaloïdes, flavonols, coumarines). De plus, l'addition d'eau dans le système d'extraction améliore le rendement des composés phénoliques glycosylés et des phénols ayant un degré de polymérisation plus élevé (**Markham., 1982**).

Il est nécessaire de noter que les solvants jouent un rôle très important dans plusieurs méthodes d'extraction. En effet, les composés phénoliques solubles sont généralement extraits en utilisant dans la première étape de macération des solvants polaires tels que l'eau, le méthanol, l'éthanol ou l'acétone. La présence de sucres, parfois liés aux polyphénols, les rend plus solubles dans l'eau, tandis que des combinaisons de solvants avec l'eau sont utilisées pour extraire les glycosides. Les aglycones moins polaires sont plus solubles dans les solvants apolaires (**Bousoussa., 2016**).

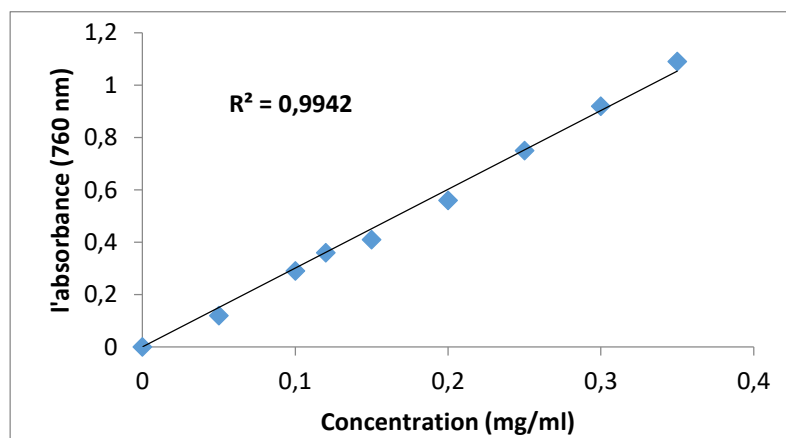
Les méthodes d'extraction en pharmaceutique, impliquent la séparation des parties médicalement actives des tissus végétaux à partir des composants inactifs / inertes en utilisant des solvants sélectifs. Lors de l'extraction, les solvants se diffusent dans la matière végétale solide et solubilisent les composés de polarité similaire (**Tiwari et al., 2011**).

On peut déduire que l'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale est influencée par plusieurs facteurs à savoir la méthode d'extraction, le temps de macération et le degré d'agitation. La température, la nature du solvant. La granulométrie de l'échantillon. L'origine géographique de la plante (climat et sol), leurs propriétés chimiques, leur polarité ainsi que leur poids moléculaire, la durée et les conditions de stockage influencent également le rendement d'extraction (**Liu et al., 2015**).

### **3. Dosage et quantification des composées phénoliques**

#### **3.1. Dosage des polyphénols totaux**

Afin de caractériser les extraits préparés à partir de la partie aérienne de la plante *Globularia alypum* L., un dosage des phénols totaux est effectué avant d'entamer l'étude des activités biologiques. La teneur en composées phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 30**), et exprimée en milligrammes par un gramme de la matière végétale sèche équivalent en acide gallique.



**Figure 30 .** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

En se basant sur les valeurs d'absorbance des diverses solutions d'extraits, ayant réagi avec le réactif de Folin-Ciocalteu et comparées à la solution étalon en équivalent d'acide gallique, les résultats de l'analyse colorimétrique des phénols totaux sont résumés dans le Tableau 9, Chaque essai a été répété au moins trois fois ainsi que, chaque valeur reportée dans ces tableaux est une moyenne.

**Tableau 9 .** Teneur en polyphénols totaux des extraits de la plante *Globularia alypum* L.

Méthodes d'extraction	Extrait	Teneur en phénols totaux (mg/g) équivalent en acide gallique
<b>Extraction hydroalcoolique</b>	Acétate d'éthyle	13,21±0,20
	Butanol	8,23±0,12
<b>Extraction aqueuse</b>	Aqueux	<b>14,84±0,07</b>
<b>Extraction par des solvants à polarité croissante</b>	Dichlorométhane	1,38±0,04
	Acétate d'éthyle	4,91 ±0,07
	Éthanol	4,54±0,40
	Méthanol	1,36±0,19

Selon les résultats mentionnés dans le Tableau 9, nous constatons que les teneurs en phénols totaux varient d'un extrait à un autre suivant les méthodes d'extraction et les solvants utilisés.

D'après la synthèse des résultats obtenus, nous observons que les teneurs en phénols totaux varient entre 1,36 et 14,84 mg EAG/g de matière sèche. Les valeurs les plus élevées ont été détectées pour l'extrait aqueux, suivi de l'acétate d'éthyle issu de l'extraction hydroalcoolique avec un taux de 13, 21 mg EAG/g de MS, tandis que l'extrait de dichlorométhane issu de l'extraction par des solvants à polarité croissante a donné la valeur la plus faible parmi tous les extraits testés.

Ceci peut s'expliquer par le fait que l'extraction aqueuse est très sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles, non seulement ceux des composés phénoliques. La méthode n'est donc malheureusement peu spécifique, car beaucoup d'autre composés réducteurs peuvent interférer avec d'autre composée que les polyphénols tels que les protéines, les sucres simples (glucose), les glycoprotéines et les pigments (**Gómez-Caravaca et al., 2006**).

D'autre part, nous ne pouvons pas écarter qu'il y a une légère différence de contenus en phénols totaux entre l'extrait d'acétate d'éthyle issue de l'extraction hydro alcoolique et l'extrait aqueux. Ceci, pourrait être dû à la polarité intermédiaire de ce solvant qui permettra de solubiliser la plupart des phénols comme les flavonoïdes aglycones et les acides phénoliques (**Nadeem et al., 2010**). Donc, nous pouvons déduire de ces résultats la richesse de notre plante au nombre important de composés phénoliques moyennement polaires solubilisés dans le solvant acétate d'éthyle, par rapport aux composés polaires extraits par les autres solvants.

Si on compare maintenant les teneurs enregistrées pour les trois méthodes d'extraction, les résultats, montrent des valeurs plus importantes dans les deux méthodes : aqueuse et hydroalcoolique par rapport à la troisième méthode d'extraction, ce qui confirme que la solubilité des composés phénoliques est régie par la nature de solvant utilisé (polarité).

Le type de solvant d'extraction doit non seulement avoir une grande capacité d'extraction de biomolécules de la plante, mais aussi bénéficier d'un certain taux de sécurité. Plusieurs auteurs ont montré que le méthanol est l'un des meilleurs solvants pour l'extraction polyphénolique (**Zlotek et al., 2016**).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Boussoualim et al (2016)**, qui ont montré dans leur étude réalisée dans la région de Sétif sur cette même espèce, que l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux donnent les valeurs les plus élevées en phénols totaux.

Par ailleurs, une étude réalisée par **Touaibia** et ses collaborateurs (**2016**), sur les feuilles de *Globularia alypum* L., avec un procédé extractif différent de celui que nous avons utilisé (extraction au Soxhlet), a montré que les teneurs en polyphénols de l'extrait éthanolique sont largement plus importantes que celles enregistrées dans la présente étude 198 mg EAG/g. Par contre (**Djeridane et al., 2010**) ont déterminé une teneur égale à 21, 54 µg EAG/g malgré leurs utilisations de la même procédure d'extraction que l'étude précédente (**Touaibia et al., 2016**).

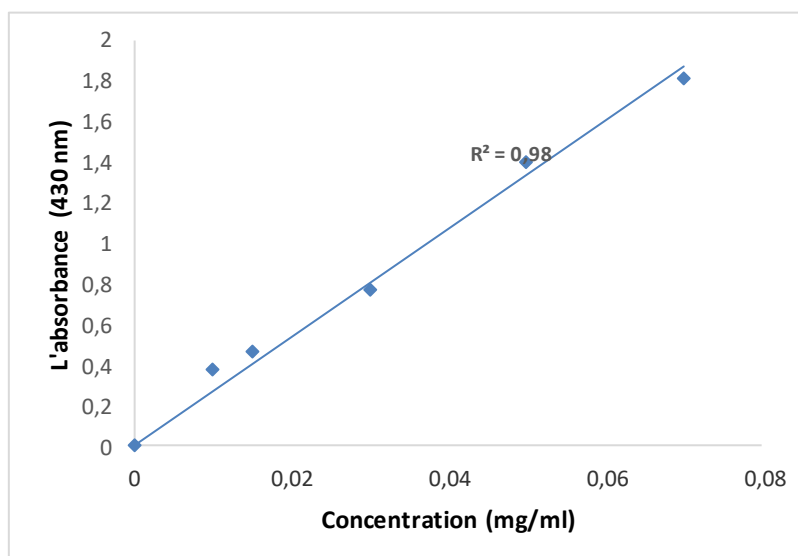
Les différences observées au niveau des teneurs peuvent être dues à la partie végétale utilisée, la saison et la région de récolte, la méthode d'extraction suivie, ainsi que le type de solvant utilisé. En effet, (**Falleh et al., 2008**) ont signalé que la solubilité des composés phénoliques est fonction de leur degré de polymérisation, de leur interaction avec les autres constituants et du type de solvant utilisé.

De plus, le test de Folin-Ciocalteu est le procédé le plus utilisé pour la quantification de composés phénoliques totaux dans les matières végétales. Cette méthode est très sensible mais, malheureusement peu spécifique, car beaucoup d'autres composés réducteurs peuvent interférer, avec d'autres composés que les polyphénols tels que les sucres, les protéines et les pigments (**Macheix et al., 2005**).

Ce test, basé sur une réaction d'oxydo-réduction, peut être également considéré comme une méthode d'évaluation de l'activité antioxydante. De ce fait, les extraits les plus riches en composés phénoliques peuvent être également considérés comme les plus antioxydants.

### 3.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes dans nos extraits a été déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage de la quercétine (**Figure 31**) et les teneurs sont exprimées en milligrammes équivalent en quercétine par gramme de matière sèche. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 10.



**Figure 31** . Courbe d'étalonnage de quercétrine

**Tableau 10** .Teneurs en flavonoïdes des extraits obtenus de la plante *Globularia alypum* L.

Méthodes d'extraction	Extrait	Teneur en flavonoïdes (mg/g) équivalent en quercétine
<b>Extraction hydroalcoolique</b>	Acétate d'éthyle	<b>4,54±0,02</b>
	Butanol	2,46±0,03
<b>Extraction aqueuse</b>	Aqueux	3,81±0,05
<b>Extraction par des solvants à polarité croissante</b>	Dichlorométhane	0,31±0,04
	Acétate d'éthyle	1,26±0,01
	Éthanol	1,05±0,02
	Méthanol	0,34±0,03

Le **Tableau 10** montre que la quantité de flavonoïdes est comprise entre 0,31 et 4,54 mg EQ/g de la matière sèche. Il paraît clairement que le taux de flavonoïdes le plus élevé a été détecté dans l'extrait d'acétate d'éthyle issu de l'extraction hydroalcoolique suivi par l'extrait aqueux et du butanol avec des valeurs de (3, 81 mg EQ/g et 2,46 mg EQ/g de matière végétale respectivement), ce qui pourrait s'expliquer par la présence d'eau dans le système d'extraction favorisant, ainsi, le passage de composés phénoliques de polarité importante. Par contre, nous avons enregistré la pauvreté de l'extrait dichlorométhane en composés phénoliques et en flavonoïdes qui est principalement due à l'hydrophobicité du solvant, qui empêche le passage des composés polaires. De ce fait, nous pouvons déduire que notre plante présente des teneurs en flavonoïdes variables selon l'extrait, la méthode d'extraction et la polarité du solvant utilisé.

Il est clair que les taux en flavonoïdes dans nos extraits sont inférieurs aux teneurs en phénols totaux, ce qui indique que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possédant d'autres structures chimiques que celle des flavonoïdes (acide phénolique, tanins, siblènes) par d'autres composés non flavonoïdiques.

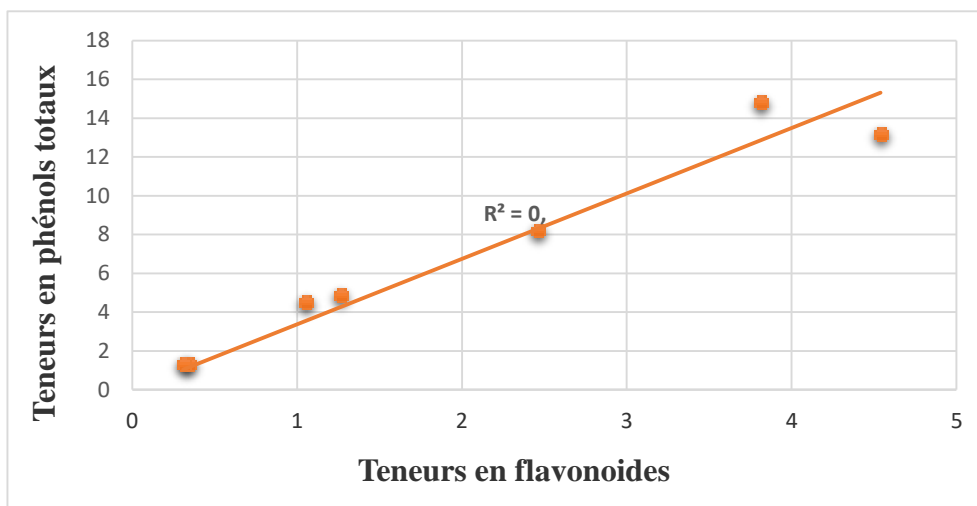
Les résultats obtenus sont conformes aux ceux de **Djeridane** et ses collaborateurs (**2006**), qui ont travaillé sur certaines espèces de la région de Laghouat. Parmi lesquelles *Globularia alypum* L., ils ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle issu de l'extraction hydroalcoolique de la même espèce, a enregistré des valeurs en flavonoïdes ne dépassant pas 21 % par rapport aux phénols totaux.

Il faut cependant noter que les résultats obtenus dans la présente étude sont nettement supérieurs à ceux trouvés par d'autres auteurs (**Krimat et al., 2014 ; Boussoualim et al., 2016**) qui ont utilisé un procédé extractif différent de celui que nous avons utilisé.

Par contre, dans une autre étude réalisée par **Ben Mansour et al. (2012)**, La teneur en flavonoïde est très loin et supérieure à nos résultats, ils ont enregistré une teneur égale à (78,82 mg EQ/g). Cette teneur a été obtenue à partir de la même espèce poussant en Tunisie, ce qui laisse supposer que l'écologie de la plante est un facteur déterminant sur sa composition en flavonoïdes.

Afin de chercher l'existence d'une corrélation linéaire entre les différents extraits de *Globularia alypum* L. Nous avons essayé de tracer la courbe représentant la variation des quantités de phénols totaux en fonction des teneurs en flavonoïdes (**Figure 32**).

Une corrélation positive assez appréciable a été enregistrée entre les taux en phénols totaux et en flavonoïdes des différents extraits avec un coefficient de corrélation (R) de 0,97.



**Figure 32 .** Corrélation entre les phénols totaux et les flavonoïdes des extraits de *Globularia alypum* L.

En conclusion, les extraits issus des méthodes d'extraction aqueuse et hydroalcoolique (aqueuse, acétate d'éthyle et butanol) ont montré une richesse importante en composés phénoliques et flavonoïdiques, qui sont susceptibles d'avoir une activité antioxydante en plus d'autres activités biologiques. Également, la présence d'eau dans le système d'extraction augmente efficacement le rendement des composés extraits et leurs qualités structurales.

## 4. Activités biologiques

### 4.1. Évaluation de l'activité antioxydante

Il existe de nombreuses méthodes qui diffèrent par leurs principes d'analyse et leurs conditions expérimentales et les antioxydants ont des contributions différentes au potentiel antioxydant total (Wojdyło *et al.*, 2007). Pour cette raison, il est recommandé d'utiliser au moins deux tests pour confirmer l'activité antioxydante. Dans cette étude, nous avons utilisé deux méthodes pour évaluer La capacité antioxydante *in vitro* de différents extraits obtenus à partir de la partie aérienne de *Globularia alypum* L. à savoir : DPPH et le test au phosphomolybdate. Ces tests ont été choisis pour leur facilité de mise en œuvre pour évaluer l'activité antioxydante. Le principe de ceux-ci repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques (Beddou., 2015).

#### 4.1. 1. Résultats du pouvoir antioxydant du radical libre DPPH

Le test de réduction du radical DPPH est largement utilisé pour l'évaluation des activités antioxydantes. Le DPPH est un radical libre qui accepte un électron ou un atome d'hydrogène pour devenir une molécule stable non radicalaire. L'effet de piégeage des extraits sur le radical DPPH est exprimé en valeurs d'EC<sub>50</sub> (µg/ml). Ce paramètre est défini comme étant la concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % de la concentration initiale en DPPH• dans le milieu réactionnel.

Les EC<sub>50</sub> des différents extraits phénoliques ont été déterminés à partir des graphes représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la variation en concentration de chaque extrait «  $I\% = f(C)$  », les graphes sont représentés dans l'**annexe 1**. Les EC<sub>50</sub> des standards choisis pour ce test, à savoir l'acide gallique, la quercétine et la vitamine C, ont été aussi déterminées afin de les comparer à celles des extraits phénoliques. Les valeurs d'EC<sub>50</sub> de chaque extrait sont résumées dans le Tableau **11**.

**Tableau 11** . Les valeurs d'EC<sub>50</sub> (µg /ml) des différents extraits de la plante *Globularia alypum* L. et des antioxydants standards

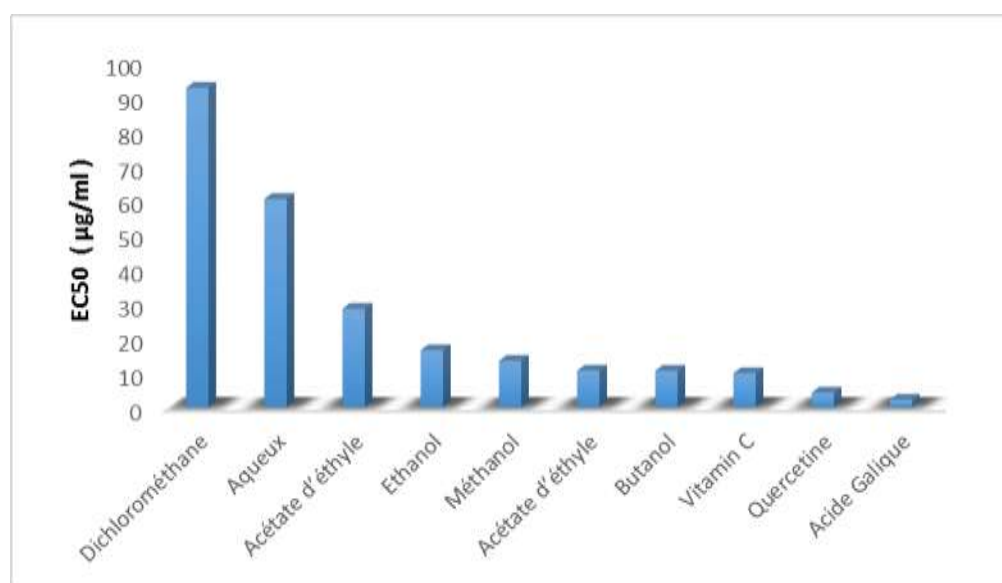
Méthodes d'extraction	Extrait	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>Extraction hydroalcoolique</b>	<b>Acétate d'éthyle</b>	10,58 ± 0,08
	<b>Butanol</b>	10,54 ± 0,02
<b>Extraction aqueuse</b>	<b>Aqueux</b>	60,24 ± 0,33
<b>Extraction par des solvants à polarité croissante</b>	<b>Dichlorométhane</b>	92,43 ± 0,04
	<b>Acétate d'éthyle</b>	28,49 ± 0,05
	<b>Éthanol</b>	16,48 ± 0,06
	<b>Méthanol</b>	13,39 ± 0,03
<b>Antioxydants standards</b>		
	<b>Acide gallique</b>	4,21 ± 0,01
	<b>Quercétine</b>	2,18 ± 0,03
	<b>Vitamine C</b>	9,85 ± 0,06

On note au regard du tableau précédent, que les extraits phénoliques de *Globularia alypum* L. possèdent un potentiel antioxydant important comparable à celui des antioxydants de référence utilisés dans ce test. Les valeurs d'EC<sub>50</sub> varient globalement entre 10,54 et 92,43 µg/ml. Tout dépend du solvant et des méthodes d'extraction.

En comparant les valeurs d'EC<sub>50</sub>, on constate que la capacité antioxydante la plus élevée qui correspond à la valeur d'EC<sub>50</sub> la plus faible a été enregistrée avec les extraits phénoliques issus de l'extraction hydroalcoolique (butanol et acétate d'éthyle) avec un EC<sub>50</sub> de l'ordre de 10,54 µg/ml et 10,58 µg/ml respectivement. Ces valeurs sont presque similaires à celles de la vitamine C qui a montré une EC<sub>50</sub> égale à 9,85 µg/ml. Par contre, l'extrait de dichlorométhane issu de la méthode d'extraction par des solvants à polarité croissante a donné un potentiel antioxydant faible comparable à celui des antioxydants utilisés comme référence.

L'activité antioxydante et la quantité de polyphénols d'un extrait sont deux paramètres qui dépendent fortement des conditions opératoires de l'extraction, de la nature et de la polarité du solvant et en particulier de la matière végétale (Bousoussa., 2016).

Afin de mieux comparer l'activité antioxydante par piégeage du radical libre DPPH de nos extraits phénoliques avec celle de quelques antioxydants de référence à savoir la vitamine C, l'acide gallique et la quercétine. Nous avons groupé dans l'histogramme présenté en **figure 33**, le classement de leurs pouvoirs antiradicalaires qui est exprimé en  $EC_{50}$ .



**Figure 33** . Histogramme représentant le classement décroissant des extraits phénoliques de la plante *Globularia alypum* L. selon leurs  $EC_{50}$

Au regard l'histogramme précédent, nous pouvons noter que l'extrait de butanol présente le pouvoir antioxydant le plus puissant par rapport aux autres extraits, alors que nous avons enregistré une faible activité antiradicalaire pour l'extrait de dichlorométhane ( $EC_{50} = 92 \mu\text{g/ml}$ ).

Par ailleurs, et selon les valeurs obtenues d' $EC_{50}$ , on s'aperçoit que les extraits issus des deux méthodes d'extraction : extraction aqueuse et extraction par des solvants à polarité croissante ont dévoilé des activités antiradicalaires nettement supérieures à celles déterminées pour les antioxydants standards. Nous pouvons donc noter que la variation de la capacité antioxydante de nos extraits par rapport à celle des antioxydants standards choisis pour l'étude pourrait être due à la teneur et/ou à la présence de certaines molécules flavonoïdes et/ou phénoliques potentiellement actives dans les extraits.

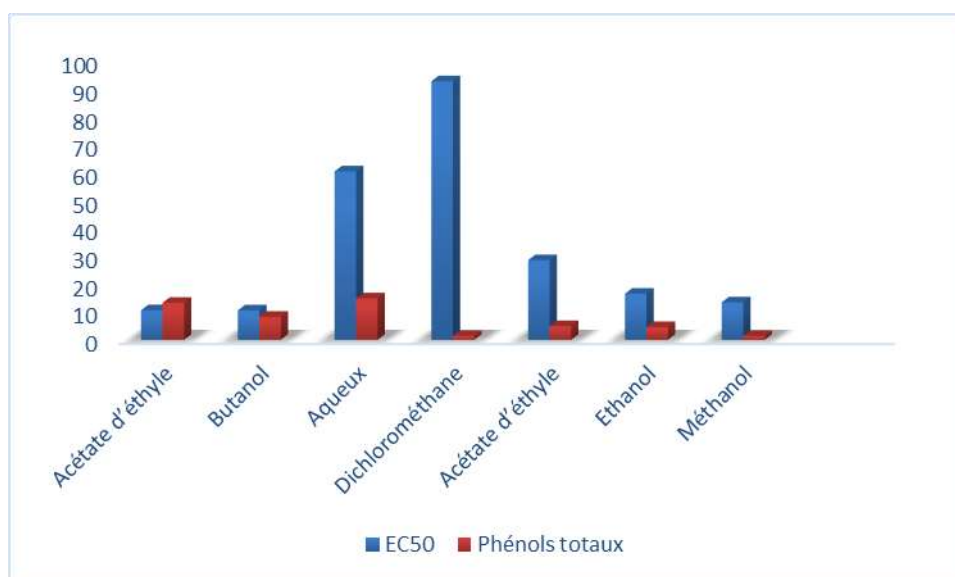
Nos résultats corroborent ceux de **Djeridane** et son équipe (**2010**), qui ont déterminé pour un extrait hydroalcoolique de *Globularia alypum* une valeur d'EC<sub>50</sub> égale à  $8,77 \pm 0,04$  µg/ml.

Une autre étude réalisée par **Bousoualim**, (**2014**), a révélé un effet inhibiteur plus puissant de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Globularia alypum* L. par rapport à l'extrait aqueux, (EC<sub>50</sub> = 37,48 et 336,58 µg/ml respectivement). Le même résultat a été observé dans une étude de **Krimat et al.** (**2014**) sur la même espèce, où la valeur d'EC<sub>50</sub> de l'extrait hydroalcoolique égale à  $39,30 \pm 1,50$  µg/ml. **Taghzouti et al.** (**2016**) ont déterminé des EC<sub>50</sub> égales à 48,28, 25,65 µg/ml pour les extraits d'acétate d'éthyle et le méthanol, respectivement (Maroc).

Ces valeurs sont largement supérieures à nos résultats ce qui indique que nos extraits sont plus actifs avec des valeurs d'EC<sub>50</sub> plus faibles. D'autre part **Ben Mansour et al.** (**2012**) ont déterminé une valeur d'EC<sub>50</sub> égale à  $6,45 \pm 0,19$  µg/ml pour un extrait éthanolique de *Globularia alypum* L. (Tunisie).

L'extrait est parfois un facteur déterminant. Ainsi, l'activité antioxydante et la quantité des phénols d'un extrait sont des paramètres qui dépendent fortement du procédé d'extraction, de la nature du solvant et de sa polarité (**Benabed**, **2018**).

De ce fait, une comparaison entre la teneur en phénols totaux et la présence d'une forte activité antioxydante pour chaque extrait est présentée dans les histogrammes ci-dessous (**Figure 34**).



**Figure 34 .** Histogrammes représentant une comparaison entre le taux en phénols totaux et l'activité antioxydante (DPPH) de chaque extrait de l'espèce *Globularia alypum* L.

De cette comparaison, on peut déduire que les extraits ayant des teneurs élevées en phénols totaux ne sont pas forcément ceux qui ont le pouvoir antiradicalaire le plus important. C'est le cas, par exemple, des extraits aqueux, car malgré la forte proportion en phénols totaux dans ce dernier, il a enregistré une faible activité antiradicalaire. Nous pouvons donc envisager que l'extrait aqueux a perdu quelques principes actifs suite à la chaleur qui auraient pu donner plus d'efficacité sur la neutralisation du radical DPPH (Lafka *et al.*, 2007).

Ainsi, nous avons essayé de chercher une corrélation entre le pouvoir antioxydant exprimé en EC<sub>50</sub> et la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes mais les résultats obtenus ont montré des corrélations très faibles ( $R < 0,1$ ). Nous pouvons expliquer cette indépendance par le fait que les extraits étudiés renferment des molécules de structures chimiques différentes et que l'activité antioxydante étudiée par ce test ne dépend pas obligatoirement de la teneur en composés phénoliques mais de leurs structures chimiques.

Asafi et ses collaborateurs (2007), ont mis en évidence la relation structure-fonction des nouveaux composés phénoliques isolés à partir de la partie aérienne de la plante *Globularia alypum* L., et leurs capacités de piéger le radical DPPH. Les résultats de cette étude ont révélé que les composés phénoliques (6-hydroxylutéoline 7-O-laminaribioside, ériodictyol 7-O-sophoroside et 6'-O-coumaroyl-1'-O- [2- (3,4-dihydroxyphényl) éthyl] -  $\beta$ -D-glucopyranoside) et des glycosides phényléthanoïdes (acteoside, isoacteoside et

forsythiaside) ont montré une forte capacité de piégeage du DPPH plus efficace que l'antioxydant utilisé comme référence : le BHT synthétique. En revanche, les mêmes auteurs ont isolé des glucosides iridoïdes de cette même espèce dans laquelle ils ont trouvé un nouvel iridoïde chloré (Globularioside) (Asafi *et al.*, 2006). En outre, il a également été rapporté que les phényléthanoïdes ont montré une activité antioxydante plus efficace que les iridoïdes et la syringine (Asafi *et al.*, 2007).

Selon Goupy *et al.* (2003), l'habilité des différents polyphénols de transférer des atomes d'hydrogène labiles au radical libre DPPH soit fortement lié à leurs caractéristiques structurales.

#### **4.1.2. Résultats du pouvoir antioxydant par le test du phosphomolybdate**

Le test de phosphomolybdate est très utilisé et adéquat pour déterminer l'activité antioxydante totale (AAT) des d'extraits de plantes. En outre, à la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des composés phénoliques mais aussi d'autres composés antioxydants tels que les vitamines (C, E...) (Muanda., 2010).

Les résultats obtenus de ce test nous ont permis de tracer les graphes présentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en composés phénoliques issus des trois méthodes d'extraction de la plante *Globularia alypum* L. De plus, nous avons tracé les courbes des antioxydants de synthèse : l'acide gallique, la quercétine et la vitamine C. (Annexe2).

L'activité antioxydante de nos extraits a été référée à celle de la vitamine C en termes d'équivalence. Donc, à partir des pentes tirées des graphes représentés dans l'annexe 2, nous avons calculé le paramètre VCEAC (*Vitamin C Equivalent Antioxydant Capacity*) pour chaque extrait (Tableau 12). Ce paramètre, est défini comme étant la concentration de la solution standard de la vitamine C possédant la capacité antioxydante équivalente à une solution de 1 mM de la substance étudiée (extrait). Plus la valeur de VCEAC n'est importante, plus le pouvoir antioxydant des extraits est important (Boussoussa., 2016).

**Tableau 12 .** Les VCEAC des différents extraits obtenus par le test phosphomolybdate

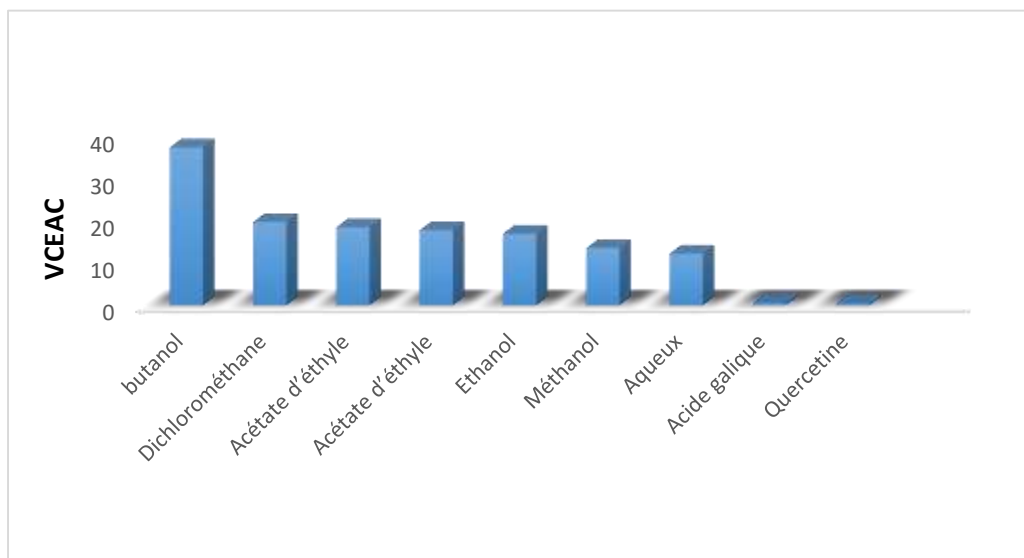
Méthodes d'extraction	Extrait	VCEAC (mg/g VCE)
<b>Extraction hydroalcoolique</b>	<b>Acétate d'éthyle</b>	18,60 ± 0,02
	<b>Butanol</b>	37,61 ± 0,04
<b>Extraction aqueuse</b>	<b>Aqueux</b>	12,29 ± 0,49
<b>Extraction par des solvants à polarité croissante</b>	<b>Dichlorométhane</b>	19,82 ± 0,005
	<b>Acétate d'éthyle</b>	17,88 ± 0,029
	<b>Éthanol</b>	17,01 ± 0,07
	<b>Méthanol</b>	13,62 ± 0,20
<b>Antioxydants standards</b>		
<b>Acide gallique</b>		0,59 ± 0,05
<b>Quercétine</b>		0,42 ± 0,03

Comme mentionné précédemment nous avons déterminé le paramètre VCEAC pour les différents extraits issus des trois méthodes. Ainsi, toutes les valeurs supérieures à un (1) indiquent une grande capacité antioxydante de nos extraits phénoliques. D'après les résultats obtenus (**Tableau 12**), nous observons que les valeurs VCEAC varient globalement entre  $12,29 \pm 49$  et  $37,61 \pm 0,04$  mg/g VCE.

Le test de molybdate-phosphate mesure la capacité antioxydante totale d'un extrait par l'estimation du degré de réduction du Mo (VI) en Mo (V), il donne une estimation directe de la capacité de réduction des antioxydants. Le transfert d'électrons se produisant dans cet essai dépend de la structure de l'anti-oxydant. Cette méthode détecte habituellement des antioxydants tels que l'acide ascorbique, les composés phénoliques, les tocophérols et les caroténoïdes (**Benabed., 2018**).

De plus, l'utilisation du test du phosphomolybdate pour l'étude de l'activité antioxydante des extraits de plantes, nous renseigne d'une façon générale sur tous les composés présentant des capacités réductrices et pouvant exister dans nos extraits.

Afin de mieux comparer les activités antioxydantes de nos extraits phénoliques, nous avons groupé dans l'histogramme qui suit (**Figure 35**) le classement décroissant des valeurs VCEAC des extraits phénoliques de la plante.



**Figure 35** . Histogramme représentant le classement décroissant des extraits phénoliques de la plante *Globularia alypum* L. selon leurs VCEAC

D'après l'histogramme précédent, nous remarquons que tous nos extraits phénoliques ont montré une activité antioxydante intéressante vis-à-vis de ce test, qui se sont manifestés par des valeurs largement supérieures à un. Comparativement aux standards utilisés.

L'extrait de butanol présente le pouvoir antioxydant le plus puissant par rapport aux autres extraits avec une valeur de VCEAC de l'ordre de 37.61 mg/ml. En revanche, l'extrait dichlorométhane a montré une activité antioxydante intéressante vis - à - vis de test phosphomolybdate alors qu'il a été enregistré une faible activité dans le test DPPH. Suivis par les extraits d'acétate d'éthyle issus de deux méthodes d'extractions hydro alcoolique et d'extraction à polarité croissantes. Alors que l'extrait aqueux a exprimé la plus faible valeur (VCEAC= 12 mg/ml).

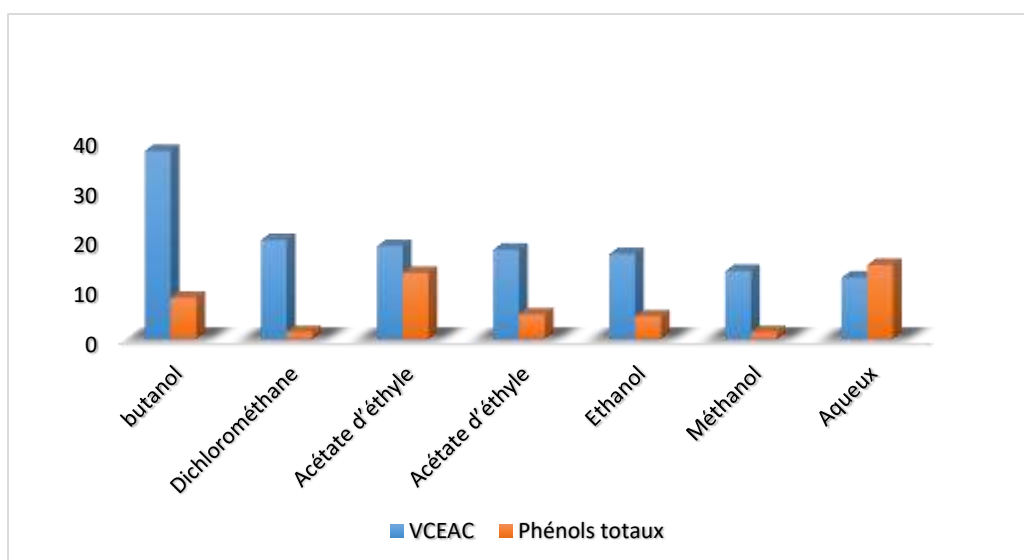
Ce résultat peut être expliqué par le fait que les composés polyphénoliques ayant activité antioxydante contre le test du phosphomolybdate ont un caractère peu et /ou moyennement polaire, de ce fait ils seront en quantité importante dans cette fraction par rapport aux autres solvants plus polaires et donneront des meilleures valeurs d' VCEAC.

Cette même remarque a été observée par **Khachba (2014)** qui a montré que les extraits dichlorométhane de la plante *Genista corsica* ont un potentiel antioxydant important et ont enregistré des valeurs d'VCEAC plus élevées.

Il est nécessaire de noter que l'investigation dans la littérature scientifique, n'a relevé aucune étude portant sur l'activité antioxydante totale par le test au phosphomolybdate des extraits phénoliques de l'espèce *Globularia alypum* L.

Bien que l'extrait butanolique de la plante *Globularia alypum* L. contienne presque la moitié de la quantité de phénols comparativement à l'extrait aqueux et à l'acétate d'éthyle de l'extraction hydroalcoolique qui ont enregistré les teneurs les plus élevées, son pouvoir antioxydant est bien meilleur. Ce comportement peut être expliqué par la nature des phénols présents dans cette fraction. Au fait, la nature des composés phénoliques est aussi un facteur qui influe sur l'activité antioxydante.

Les histogrammes ci-dessous montrent une comparaison entre la teneur en phénols totaux et l'activité antioxydante testée au phosphomolybdate.



**Figure 36 .** Histogrammes représentant une comparaison entre le taux en phénols totaux et l'activité antioxydante (phosphomolybdate) de chaque extrait de l'espèce *Globularia alypum* L.

Sur la base de cette représentation, nous pouvons conclure que le pouvoir antioxydant et la teneur en phénols totaux ne varient pas dans le même sens pour tous les extraits puisque nous observons que l'extrait aqueux considéré comme le plus riche en phénols totaux ne possède pas la meilleure valeur de VCEAC. En revanche, On peut noter que les extraits issus de la méthode d'extraction par des solvants à polarité croissante (dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol, méthanol) et malgré la faible proportion de phénols totaux dans ces derniers, ils ont présenté des propriétés antioxydantes intéressantes qui se sont exprimées par des valeurs de VCEAC très importantes.

Cette constatation a été aussi confirmée par l'absence de toute corrélation entre l'activité antioxydante et les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes ( $R^2 < 0,1$ ).

D'autre part, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les  $EC_{50}$  du test DPPH, qui mesure que l'activité antioxydante d'espèce donatrice d'hydrogène, et les valeurs de VCEAC. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les mécanismes réactionnels des deux tests sont complètement différents. En fait, la capacité antioxydante des composés phénoliques est due à leur capacité donatrice d'hydrogène et au nombre de groupes hydroxyles présents, qui à leur tour sont étroitement liés à la fois à la structure chimique et à la conformation spatiale, ce qui permet de modifier la réactivité des molécules (Molyneux., 2004).

Notre étude a mis en évidence l'impact du procédé d'extraction sur la qualité des extraits obtenus, notamment en termes d'activité antioxydante et a montré l'importance du choix de la méthode d'extraction, qui s'avère une étape cruciale dans une étude de valorisation des plantes médicinales afin d'obtenir des principes actifs.

#### **4. 2. Évaluation de l'activité antidiabétique**

L'une des méthodes adoptées pour soigner le diabète sucré consiste à retarder et à réduire la digestion et l'absorption des hydrates de carbone ingérés par l'inhibition de l'  $\alpha$ -amylase et l'  $\alpha$ -glycosidase dans les organes digestifs. L'inhibition des enzymes impliquées dans la digestion des glucides peut diminuer de manière significative l'augmentation postprandiale du glucose dans le sang en retardant le processus d'hydrolyse et d'absorption des glucides (Khacheba *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont été consacrées à l'isolement des composés inhibiteurs d' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase d'extraits des plantes. Ces inhibiteurs isolés ont été rapportés d'être efficaces pour diminuer la glycémie avec des effets secondaires minimes (Adediwura *et al.*, 2009 ; Shobana *et al.*, 2009).

#### 4. 2. 1. Test d'inhibition

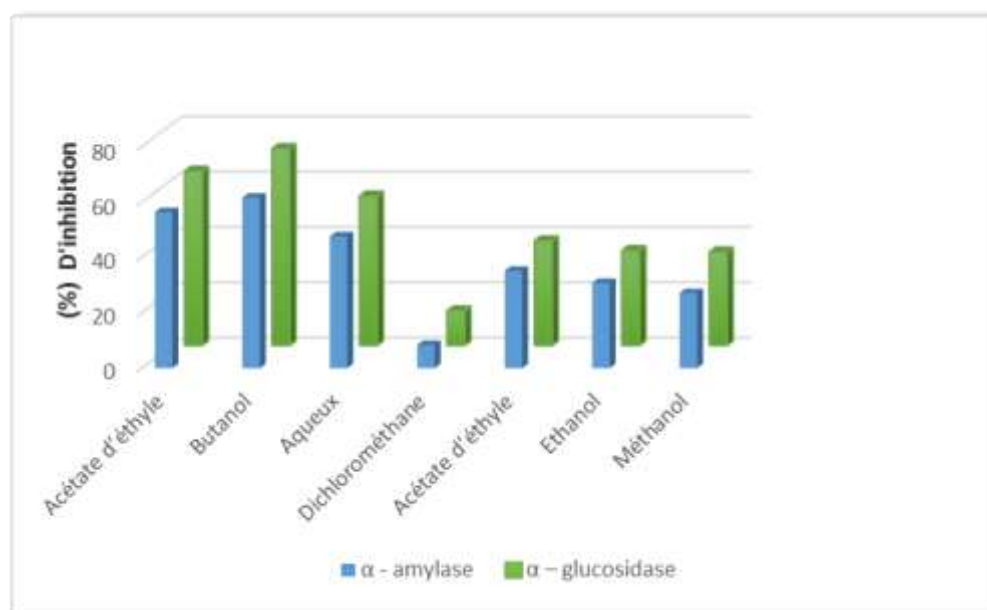
Dans le but de repérer les extraits ayants une capacité inhibitrice vis - à - vis de l' $\alpha$  - amylase et l' $\alpha$  - glucosidase, des tests d'inhibitions *in vitro* ont été effectués à la même concentration d'extraits. Les différents taux d'inhibition sont consignés dans le **Tableau 13**.

**Tableau 13** : Taux d'inhibition des extraits phénoliques de la plante *Globularia alypum* L. vis - à vis de l' $\alpha$  - amylase et de l' $\alpha$  – glucosidase

Méthodes d'extraction	Extrait	Taux d'inhibition (%)	
		$\alpha$ - amylase	$\alpha$ – glucosidase
Extraction hydroalcoolique	Acétate d'éthyle	56,43 $\pm$ 0,35	63,08 $\pm$ 0,72
	Butanol	61,65 $\pm$ 0,78	71,22 $\pm$ 1,35
Extraction aqueuse	Aqueux	47,65 $\pm$ 1,54	54,06 $\pm$ 0,38
Extraction par des solvants à polarité croissante	Dichlorométhane	8,38 $\pm$ 1,61	12,52 $\pm$ 0,78
	Acétate d'éthyle	35,23 $\pm$ 0,51	37,85 $\pm$ 2,36
	Éthanol	30,81 $\pm$ 1,72	34,35 $\pm$ 0,49
	Méthanol	27,12 $\pm$ 2,02	33,82 $\pm$ 0,82

Suite aux résultats des tests d'inhibition, nous avons constaté que tous les extraits phénoliques préparés présentent un potentiel d'inhibition vis - à - vis des deux enzymes l' $\alpha$  - amylase et l' $\alpha$  - glucosidase à différents taux d'inhibition plus ou moins significatifs. Les valeurs calculées sont comprises pour les deux enzymes entre 8,38% et 71,22 %.

Les résultats obtenus montrent que les pourcentages d'inhibition des extraits sont supérieurs à 50% excepté les extraits issus de l'extraction par des solvants à polarité croissante dont les pourcentages n'ont pas dépassé 38%. Nous avons constaté que les extraits issus de l'extraction hydroalcoolique et l'extraction aqueuse ont un pouvoir inhibiteur important sur l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase ; les meilleurs pourcentages d'inhibition sont enregistrés pour l'extrait butanol, Par contre, la fraction dichlorométhane issue de l'extraction par des solvants à polarité croissante a montré les taux d'inhibition les plus faibles, et ce pour les deux enzymes (**Figure 37**).



**Figure 37** . Pourcentages d'inhibition des extraits phénoliques de *Globularia alypum* L. vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase

D'après ces résultats, nous avons remarqué que les taux d'inhibitions obtenues d' $\alpha$ -glucosidase nettement plus élevés par rapport à ceux de l' $\alpha$ -amylase. Cette constatation est d'une grande importance pharmaceutique et ceci dans le but de réduire certains effets secondaires associés à la prise de médicaments (actuellement utilisés pour le traitement du diabète de type 2 : (l'acarbose et le voglibose) et qui sont liés à une inhibition excessive de l' $\alpha$ -amylase. Donc, une importante inhibition de cette enzyme par les extraits phénoliques entraînerait une lente décomposition des disaccharides ; ce qui va réduire l'absorption du glucose de l'intestin grêle (**Kwon et al., 2007**). Par conséquent, le contrôle de l'hyperglycémie pourrait être atteint par l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase.

Il est clair que les pourcentages d'inhibition des extraits phénoliques diffèrent entre les deux enzymes et d'un extrait à un autre. Ce constat peut être expliqué par le fait que la composition en composés phénoliques et leurs structures chimiques dans nos extraits de l'espèce *Globularia alypum* L. varient avec la méthode d'extraction, le type et la polarité du solvant utilisé, ce qui mène à différents contacts avec le site actif de chaque enzyme, ce qui prouve que la composition et la structure jouent un rôle important dans l'inhibition (Khacheba.,2014).

À notre connaissance, aucune activité inhibitrice d' $\alpha$ - amylase et d' $\alpha$ - glucosidase n'a été rapportée sur les extraits phénoliques de l'espèce étudiée, qui pourrait constituer une nouvelle source d'inhibiteurs pour le traitement du diabète sucré.

#### **4. 2. 2. Étude des pouvoirs anti-amylasiques et anti- glucosidiques de *Globularia alypum* L.**

Après avoir confirmé l'existence d'activité inhibitrice pour chaque extrait par le test précédent et on se basant sur les résultats, trois extraits ont été choisis pour procéder à l'étude *in vitro* de l'activité amylasique et glucosidasique ; afin de déterminer pour chaque extrait et dans les mêmes conditions réactionnelles le paramètre  $IC_{50}$  qui représente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse réactionnelle jusqu'à 50% de sa valeur maximale non- inhibée. Pour cela, nous avons varié la concentration en inhibiteurs et nous avons introduit 100 $\mu$ l des différentes concentrations.

Les mesures ont été effectuées avec de l'amidon et du saccharose comme substrats. Nous avons néanmoins choisi ces substrats essentiellement pour la commodité de réaliser le dosage par des méthodes photométriques.

Les représentations graphiques de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits (**Annexe 3**), nous ont permis de déterminer les valeurs d' $IC_{50}$  pour chaque extrait que nous avons regroupé dans le tableau ci dessous.

**Tableau 14 .** Taux d'inhibition des extraits phénoliques de *Globularia alypum* L. vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase

Méthodes d'extraction	Extrait	Les IC <sub>50</sub> mg /ml)	
		$\alpha$ – amylase	$\alpha$ – glucosidase
Extraction hydroalcoolique	Acétate d'éthyle	4,46 ± 0,02	0,65 ± 0,18
	Butanol	1,78± 0,04	0,22 ± 0,01
Extraction aqueuse	Aqueux	7,68 ± 0,31	1,12 ± 0,06

Les valeurs obtenues pour les trois extraits (acétate d'éthyle, butanol et extrait aqueux) sont comprises entre  $0,22 \pm 0,01$  et  $7,68 \pm 0,31$  mg/ml. De ces résultats, nous pouvons déduire que nos extraits sont plus puissants à inhiber l'alpha-glucosidase par rapport à l'alpha-amylase et ceci avec des IC<sub>50</sub> nettement plus faibles.

Nous avons constaté un résultat remarquable pour les fractions moyennement polaires, à savoir l'acétate d'éthyle et le butanol avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> inférieures ce qui prouve l'existence de molécules ayant un effet inhibiteur très intéressant. L'extrait butanolique a montré un résultat très intéressant vis-à-vis de l'alpha-glucosidase (IC<sub>50</sub> =  $0,22 \pm 0,01$  mg /ml), ceci peut être expliqué par la richesse de cette fraction en molécules spécifiques conférant une activité inhibitrice plus efficace.

Les inhibiteurs d'enzyme peuvent agir selon des mécanismes variés, en se combinant soit avec l'enzyme (inhibition compétitive ou incompétitive), soit avec le complexe enzyme substrat (non compétitive), soit avec le substrat lui-même (Weinman *et al.*, 2004).

En effet, les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues de la méthode d'extraction hydro-alcoolique sont toutes meilleures que celles obtenues de l'extraction aqueuse, ceci peut être dû à l'effet de la chaleur sur la structure des principes actifs.

**Khacheba** et ces collaborateurs en 2017, ont étudié *in vitro* l'effet inhibiteur des extraits hydroalcooliques et aqueux de dix-huit plantes sur les deux enzymes  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase, ils ont expliqué que la faible activité d'extrait aqueux peut être attribuée à

l'enzyme oxydase des polyphénols, qui a peut – être dégradé les polyphénols extraits dans de l'eau, tandis que dans le méthanol et l'éthanol elles sont inactives. De plus l'eau est un meilleur milieu pour l'apparition des microorganismes.

L'activité inhibitrice enzymatique de plusieurs plantes est due aux composés polyphénoliques, plusieurs de ces polyphénols ont une action sur  $\alpha$  – amylase tels que les tannins qui sont capables de se lier aux enzymes digestives et de les inhiber (**Tundis *et al.*, 2010**).

De ce fait, en comparant les résultats de l'activité antidiabétique de nos extraits, d'une part, et les teneurs en phénols totaux d'autre part, nous avons remarqué que les teneurs en phénols totaux et les valeurs en  $IC_{50}$  varient de manière inversement proportionnelle, car pour les extraits riches en phénols totaux, on remarque une faible inhibition vis-à-vis des enzymes  $\alpha$  – amylase et  $\alpha$  – glucosidase. Nous prenons comme exemple, l'extrait aqueux dont la quantité est élevée en phénols et flavonoïdes inhibe faiblement les deux enzymes, par contre, l'extrait de butanol a enregistré une forte activité inhibitrice malgré leur teneur faible en polyphénols et flavonoïdes.

De ce fait on peut dire que les polyphénols et les flavonoïdes ne sont pas les seules molécules qui influent sur l'activité enzymatique, et qu'il est probable qu'une synergie entre différents métabolites est responsable de l'inhibition. D'autre part on peut supposer également que l'inhibition est une relation structure fonction et nom structure quantité.

D'après les résultats de l'activité antioxydante de nos extraits, nous avons constaté que les extraits issus de l'extraction hydroalcoolique présentent l'activité antioxydante la plus prononcée. Ceci, a été aussi prouvé avec les deux enzymes responsables de l'hydrolyse des carbohydrates et de l'absorption intestinale respectivement, où les plus importantes inhibitions ont été enregistrées dans l'extrait butanolique qui a dévoilé la valeur d' $IC_{50}$  la plus faible.

Par conséquent, nous avons décidé de choisir les deux extraits qui ont prouvé leur efficacité dans les tests précédents (acétate d'éthyle et butanol, de l'extraction hydroalcoolique), afin de tester leur activité antimicrobienne et de les comparer toujours par l'extrait aqueux qui a été enregistré la meilleure valeur de phénols totaux.

### 4.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne

Nous avons effectué un criblage de l'activité antimicrobienne sur 8 germes pathogènes dont 5 bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhi*) et 3 souches fongiques (*Aspergillus flavus*, *Penicillium sp* et *Fusarium oxysporum*).

#### 4.3.1. Évaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de nos extraits est déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, qui est une technique qualitative basée sur la mesure des diamètres des zones d'inhibition qui apparaissent autour des disques contenant les extraits à tester. Dans le (Tableau 15) sont incluses les valeurs en (mm) des zones ou diamètres d'inhibitions relatives aux différentes souches testées.

**Tableau 15 .** Diamètre (mm) des zones d'inhibition des extraits de *Globularia alypum* L. contre les souches bactériennes

Souches	Zones d'inhibition des microorganismes testés (mm)											
	Acétate d'éthyle				Butanol				Aqueux			
	50 mg/ml	60 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	60 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	60 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml
<i>Staphylococcus Aureus</i>	12,66 ± 0,15	13,3 ± 0,1	15 ± 0,36	18 ± 0,46	11,83 ± 1,15	12,16 ± 0,96	13,66 ± 0,85	15,33 ± 0,76	10,16 ± 0,35	10,33 ± 0,47	11,83 ± 0,40	12,5 ± 0,5
<i>Enterococcus Faecalis</i>	ND	9 ± 0,36	12,16 ± 0,35	13,5 ± 0,91	ND	8 ± 0,2	11,16 ± 0,35	11,5 ± 0,35	ND	ND	7,66 ± 0,40	9,66 ± 0,76
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	11 ± 0,2	12,5 ± 0,29	14 ± 0,17	15,5 ± 0,2	9,66 ± 0,72	10,66 ± 0,29	11,83 ± 0,57	12,16 ± 0,61	8,16 ± 0,85	9,66 ± 0,76	9,83 ± 0,35	10,66 ± 0,76
<i>Escherichia coli</i>	ND	9,5 ± 0,7	11 ± 0,26	13 ± 0,36	ND	ND	8,5 ± 0,65	9,33 ± 0,23	ND	ND	ND	ND
<i>Salmonella typhi</i>	8 ± 0,26	9,16 ± 0	10,5 ± 0,61	11,5 ± 0,3	ND	ND	9,5 ± 0,62	10,66 ± 0,47	ND	ND	8 ± 0,2	10 ± 0,4

ND : Non déterminé.

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de *Globularia alypum* L. par la méthode des disques, nous révèlent une variation des diamètres des zones d'inhibition allant de 0 à  $18 \pm 0,46$  mm, selon les souches microbiennes testées et le type d'extrait.

Un extrait est considéré comme antibactérien lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm (Tekwi et al., 2012).

Il ressort des résultats obtenus que les extraits : acétate d'éthyle et butanol ont un effet inhibiteur de la croissance de la plupart des souches bactériennes testées, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii*, aussi bien sur les bactéries Gram positives que Gram négatives. Ces différences semblent indiquer que les deux extraits ont un taux plus élevé ou plus de principes actifs antibactériens que l'extrait aqueux.

L'absence de la membrane externe des bactéries Gram positives les rend plus sensibles aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels (Saffidine., 2015), par contre, les bactéries à Gram négatif ayant une paroi phospholipidique externe agissent comme une barrière de diffusion et rendent les cellules moins sensibles aux agents antimicrobiens. (Hailu et al., 2005).

L'extrait d'acétate d'éthyle a montré de manière significative l'activité antibactérienne la plus élevée contre les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres d'inhibition de  $15,5 \pm 0,2$  et  $18 \pm 0,46$  mm respectivement, suivis par l'extrait butanolique et l'extrait aqueux. Ces résultats consolident ceux rapportés dans la littérature que les composés phénoliques montrent la plus grande activité antibactérienne et que la souche *Staphylococcus aureus* est plus particulièrement sensible aux composés phénoliques (Cowan., 1999).

L'extrait aqueux a montré une activité inhibitrice uniquement sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition de 10,66 et 12,5 mm, respectivement). En revanche, Aucune inhibition des bactéries à Gram négatif *Escherichia coli*, n'a été enregistrée avec ce même extrait. Cette modeste activité pourrait s'expliquer par le fait que les substances hydrosolubles ne peuvent accéder aux substances non hydrosolubles des cellules bactériennes. Selon Candan (2003), les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Elles n'ont pas la même capacité que des molécules liposolubles qui

s'intercalent dans les membranes des cellules bactériennes et les endommagent (Bousoualim., 2014).

D'autre part, Das *et al.* (2010) ont supposé que l'extraction à partir de solvants organiques donne une activité antimicrobienne plus significative.

Taghzouti *et al.* (2016), ont étudié l'effet antimicrobien des composés phénoliques de l'espèce *Globularia alypum* L. collectée dans une région du Maroc. Ces auteurs, ont détecté que l'extrait d'acétate d'éthyle de cette espèce présentait une inhibition vis-à-vis des souches *Staphylococcus Aureus* et *Bacillus subtilis* avec des diamètres d'inhibition de 10.83 et 16.66 mm respectivement.

Une autre étude faite par Bousoualim (2014) a trouvé presque le même diamètre d'inhibition avec l'extrait acétate d'éthyle de *Globularia alypum* L. vis-à-vis les souches *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa* et *Salmonella typhi*. D'autre part, elle a constaté l'absence de tout effet d'extrait aqueux sur les bactéries *Escherichia coli* et *Enterococcus Faecalis*.

Contrairement à nos résultats, Kada (2018) a trouvé que l'extrait aqueux et méthanolique de *Globularia alypum* L., n'ont aucun effet antibactérien, sur les souches *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, mais ils ont montré un effet antibactérien avec *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* et *Salmonella typhi*.

En général, l'activité antibactérienne des substances actives d'origine végétale dépend de plusieurs facteurs à savoir : l'espèce de la plante, la préparation de l'extrait, le solvant utilisé, et la sensibilité des bactéries (Basli *et al.*, 2012).

#### **4.3.2. Évaluation de l'activité antifongique**

L'activité antifongique des extraits (acétate éthyle, butanol et aqueux) a été testée par la méthode du contact direct, *in vitro*, sur trois souches isolées, sur un milieu gélosé PDA pour déterminer les taux d'inhibition, en comparant leur action à diverses concentrations sur la croissance mycélienne. (Tableau 16).

**Tableau 16 .** Pourcentage d'inhibition des extraits phénoliques de *Globularia alypum* L. relatif aux souches pathogènes fongiques

	Pourcentage d'inhibition (%)								
	Acétate d'éthyle			Butanol			Aqueux		
	50 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml
<i>Aspergillus flavus</i>	31,81 %	39,39 %	43,93 %	28,78 %	34,84 %	37,87 %	0%	0%	0%
<i>Penicillium spp</i>	43,47 %	52,17 %	58,69 %	36,95 %	45,65 %	47,82 %	0%	0%	0%
<i>Fusarium oxysporum</i>	47,22 %	58,33 %	66,66 %	37,5 %	44,44 %	51,38 %	12,12 %	16,66 %	19,69 %

Les essais antifongiques réalisés, montrent que les extraits de *Globularia alypum* L., possèdent des effets antifongiques variables en fonction de la souche et la concentration appliquée. D'après **Djabali et Barkat (2012)**, l'extrait polyphénolique est dit : très actif lorsqu'il possède une inhibition entre 75 et 100 % ; la souche fongique est dite très sensible ; actif lorsqu'il possède une inhibition entre 50 et 74 % ; la souche fongique est dite sensible ; moyennement actif lorsqu'il possède une inhibition entre 25 et 49 % ; la souche est dite limitée ; peu ou pas actif lorsqu'il possède une inhibition entre 0 et 24 % ; la souche est dite peu sensible ou résistante.

Les résultats du pourcentage d'inhibition des extraits déterminés à partir des diamètres des zones d'inhibition (**Annexe 4**) montrent que les trois extraits testés exercent un effet antifongique remarquable qui dépend de la souche testée et de l'extrait utilisé. Cette activité a été plus prononcée avec les extraits d'acétate d'éthyle et de butanol qui ont manifesté un bon pouvoir antifongique. Les moisissures ont montré une sensibilité accrue à l'augmentation de la concentration des extraits dans leur milieu de culture où le diamètre de la colonie était réduit à chaque fois qu'on augmente la concentration.

Nous avons remarqué aussi que l'extrait d'acétate d'éthyle a exercé une activité inhibitrice sur toutes les souches mycéliennes testées avec un pourcentage d'inhibition variant 43,93 % sur *Aspergillus flavus* à 66,66 % sur *Fusarium oxysporum* à la concentration de 100 mg / ml. Cette observation pourrait être due à la présence de certaines substances ayant des capacités fongiques plus élevées. En revanche, aucune activité n'est par ailleurs notée sur les deux souches fongiques *Aspergillus flavus* et *Penicillium spp* en présence de l'extrait aqueux qui n'était actif que sur *Fusarium oxysporum* (Figures 38, 39 et 40).

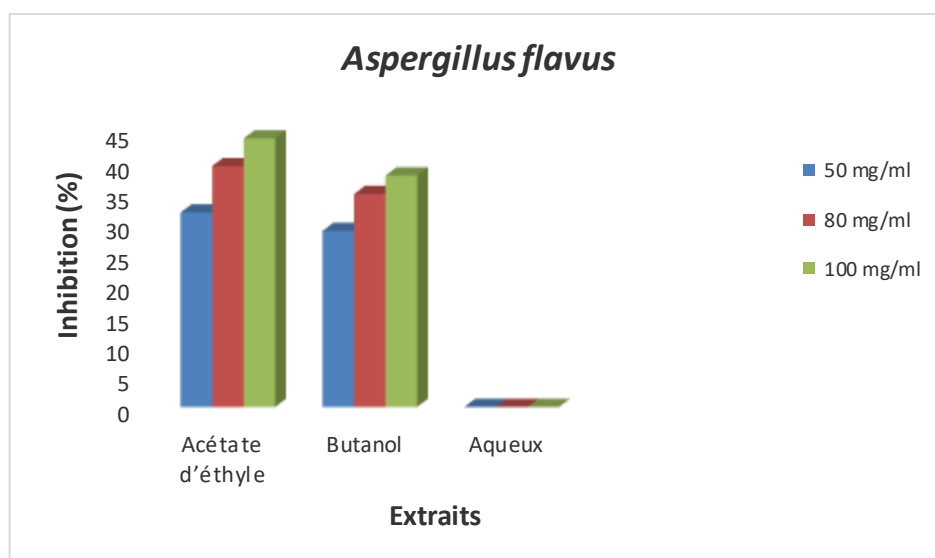


Figure 38 . Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de la souche fongique *Aspergillus flavus* par les extraits de *Globularia alypum* L.

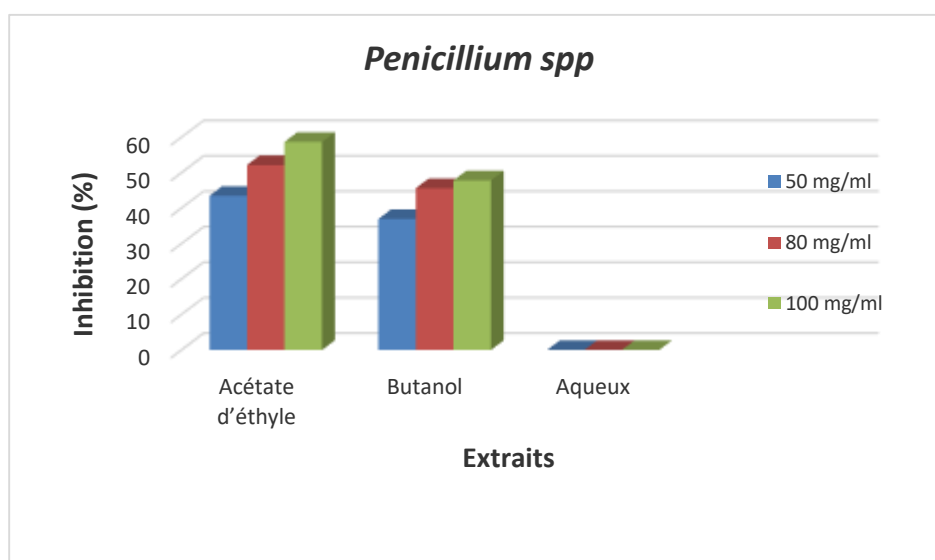
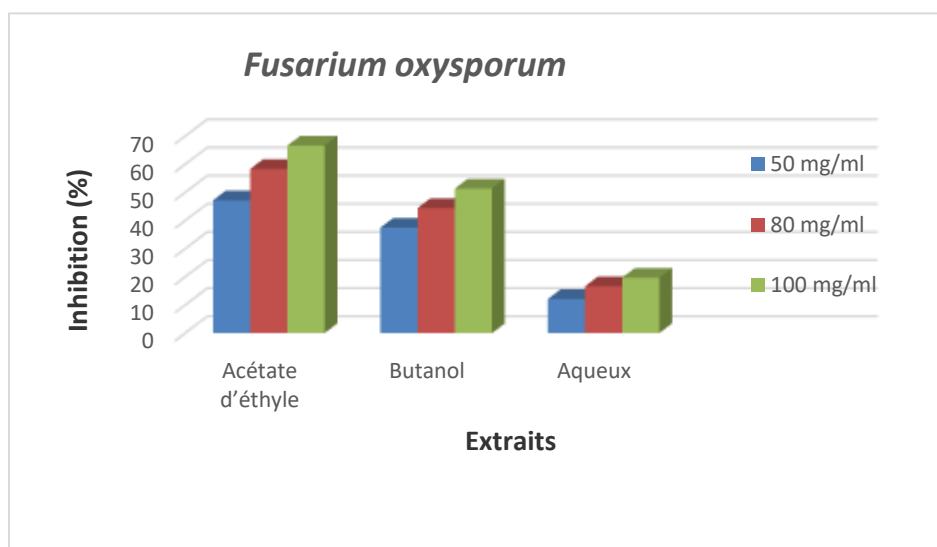


Figure 39 . Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de la souche fongique *Penicillium spp* par les extraits de *Globularia alypum* L.



**Figure 40 .** Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de la souche fongique *Fusarium oxysporum* par les extraits de *Globularia alypum* L.

À travers ces résultats, nous pouvons également conclure que les extraits étudiés ont montré des activités variables sur les souches testées. La souche *Fusarium oxysporum* semble être la plus sensible et l'extrait le plus actif est l'acétate éthyle. En effet, les différentes concentrations d'extraits ont influencé de façon significative la croissance des moisissures, les concentrations élevées étant plus inhibitrices.

Selon **Bougandoura et Bendimerad (2012)**, les extraits méthanoliques sont plus actifs que les extraits aqueux. Cette différence peut être due à l'origine de la composition chimique différente entre ces extraits, le méthanol permet une meilleure extraction des composés moins polaires comme les flavonoïdes et les terpénoïdes qui sont des molécules reconnues pour leur activité antifongique. En outre, l'eau agirait beaucoup plus sur les substances inactives qu'actives, alors que le méthanol plus sélectif agirait plus sur des substances actives contre le pathogène. Cette hypothèse corrobore avec les travaux de **Boussoualim (2014)**, qui a rapporté que l'extraction au méthanol était plus efficace sur l'activité antimicrobienne que celle à l'eau.

De nombreuses études ont révélé la relation contradictoire entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir antimicrobien. (**Shirazd et al., 2011 ; Djabali et Barkat., 2012**). En effet, **Tatsadjieu et al. (2007)** et **Raza et al. (2015)** ont rapporté que les extraits végétaux contiennent des composés tels que les tanins, les flavonoïdes et les alcaloïdes qui sont dotés de propriétés fongicides.

Peu de travaux de recherche concernant l'activité antifongique des polyphénols de *Globularia alypum* L. sont disponibles. L'étude de **Taghzouti et al. (2016)** sur l'extrait méthanolique et l'acétate d'éthyle de *Globularia alypum* L., a montré que ces extraits n'ont pas d'activité inhibitrice sur *Candida albicans*. Le même résultat a été observé dans une étude réalisée par **Kada (2018)** sur cette même espèce, où l'extrait aqueux et méthanolique présentent une très faible activité contre la levure (des zones d'inhibition entre 2-4 mm).

Néanmoins, aucune donnée bibliographique n'est aujourd'hui disponible sur l'activité antifongique des extraits de *Globularia alypum* L. sur les souches testées dans notre étude ce qui constitue un des intérêts de ce travail.

# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

Les plantes ont toujours été une source essentielle de substances naturelles bioactives telles les polyphénols, ces molécules suscitent actuellement l'intérêt de plusieurs chercheurs en raison des bénéfices pour la santé qu'elles pourraient procurer à l'homme.

Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante, antidiabétique et antimicrobienne des extraits phénoliques obtenu par trois méthodes d'extractions de la partie aérienne d'une plante spontanée du Sahara septentrional largement utilisées dans la médecine traditionnelle : *Globularia alypum* L. Elle été choisie parmi les espèces les moins étudiées tout en tenant compte de leur caractère endémique. Donc, ce travail est une contribution à une meilleure connaissance de cette espèce végétale.

Le screening phytochimique réalisé par les réactions de caractérisation nous a permis de mettre en évidence la présence de divers métabolites secondaires tels que : polyphénols, flavonoïdes, tanins, stérols, triterpènes, coumarines, saponosides dans cette plante.

Les résultats de ce balayage phytochimique nous amène à extraire différents composés phénoliques dans notre plante. Après l'extraction de ces différents métabolites, nous avons évalué les quantités de phénols totaux et de flavonoïdes dans les extraits de cette plante ; les teneurs varient respectivement entre  $1,36 \pm 0,19$  et  $14,84 \pm 0,07$  mg en équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche et entre  $0,31 \pm 0,04$  et  $4,54 \pm 0,02$  mg équivalent en quercétine par gramme de la matière sèche.

Ensuite, nous avons procédé à l'évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits et de quelques antioxydants commerciaux pris comme références (acide gallique, quercétine, et Vitamine C) par deux tests chimiques *in vitro* le test du DPPH et le test du phosphomolybdate, ont décelé des activités antioxydantes très intéressantes chez la plante étudiée et nettement supérieures à celles déterminées pour les antioxydants standards avec des valeurs d' $EC_{50}$  comprises entre  $10,54 \pm 0,02$  et  $92,43 \pm 0,04$   $\mu\text{g/ml}$  pour le test DPPH et des valeurs de VCEAC de  $12,29 \pm 0,49$  et  $37,61 \pm 0,04$ .

À la recherche de l'activité inhibitrice de différents extraits de *Globularia alypum* L. nous avons testé l'effet inhibiteur de : extraits aqueux, butanol et acétate d'éthyle sur deux hydrolases  $\alpha$  - amylase et  $\alpha$  - glucosidase. Nous avons pu prouver *in vitro* à travers cette étude la capacité inhibitrice de ceux-ci, avec de faibles valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'ordre du mg/ml. Les valeurs de ces paramètres varient entre  $1,78 \pm 0,04$  mg/mL et  $7,68 \pm 0,31$  mg/ml pour l' $\alpha$ -amylase et entre  $0,22 \pm 0,01$ mg/ml et  $1,12 \pm 0,06$  mg/ml pour l' $\alpha$  – glucosidase.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de nos extraits (aqueux, butanol et acétate d'éthyle) a été démontrée *in vitro* par la méthode de diffusion sur disque contre quelques germes pathogènes. Les résultats montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait de butanol ont révélé une activité antibactérienne contre la souche de *staphylococcus aureus* et même la souche multi-résistante aux antibiotiques (*Pseudomonas aeruginosa*).

D'autre part, le test antifongique réalisé par la méthode du contact direct contre trois souches : *Aspergillus flavus*, *Penicillium ssp*, et *Fusarium oxysporum* montre que les extraits testés possèdent des effets antifongiques variables selon la souche et de la dose appliquée. Le champignon *Fusarium oxysporum* semble être la souche fongique la plus sensible et l'extrait d'acétate d'éthyle de l'extraction hydro alcoolique est le plus actif. Cette étude a montré pour la première fois que les extraits phénoliques de *Globularia alypum* L. peuvent être des substances bactériostatiques et bio- fongicide.

Il ressort de ce travail que *Globularia alypum* L. est un produit fort intéressant et riche en molécules bioactives qui pourrait être utilisé en pharmaceutique. Les résultats obtenus sont très encourageants et prometteurs tant au niveau de l'activité antiradicalaire, antimicrobienne qu'au niveau de l'activité antidiabétique.

Pour la continuité de ce travail avec plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être tirées à l'issue des résultats obtenus dans ce travail :

- ✚ élargir le spectre d'activités biologiques ciblées, en incluant l'activité anti-inflammatoire, antivirales, anticancéreuse, ainsi que leur effet sur d'autres enzymes.
- ✚ isoler et identifier les principes actifs les principes actifs et les molécules responsables de ces propriétés pharmacologiques ainsi que leurs modes d'actions.
- ✚ étudier la toxicité des extraits pour déterminer leur utilisation.
- ✚ étudier les propriétés phytochimiques, pharmaceutiques et ethnobotaniques d'autres plantes locales utiles qui n'ont pas été étudiées et qui mériteraient d'être investiguées dans les domaines étudiés.

# **Références Bibliographiques**

- Adediwura, F. J., & Kio, A. (2009).** Antidiabetic activity of Spondias mombin extract in NIDDM rats. *Pharmaceutical Biology*, 47(3), 215-218.
- Akagawa, M., & Suyama, K. (2001).** Amine oxidase-like activity of polyphenols: Mechanism and properties. *European journal of biochemistry*, 268(7), 1953-1963.
- Akroum, S. (2011).** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels.
- Alexis, D. S., & Joachim, L. A. (2016).** Quelques méthodes d'analyse biochimique de produits alimentaires. *Connaissances et savoir. Boulevard anatole france-93200 Saint-Denis*.
- Alwash, M. S., Ibrahim, N., & Ahmad, W. Y. (2013).** Identification and mode of action of antibacterial components from *Melastoma malabathricum* Linn leaves. *American journal of infectious diseases*, 9(2), 46-58.
- Amiot, M. J., Fleuriet, A., & Macheix, J. J. (1986).** Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(5), 823-826.
- Amiri, B., Hosseini, N. S., Taktaz, F., Amini, K., Rahmani, M., Amiri, M., & Esmaeili, S. (2019).** Inhibitory effects of selected antibiotics on the activities of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase: *In-vitro*, *in-vivo* and theoretical studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 138, 105040.
- Andrade-Cetto, A., Becerra-Jiménez, J., & Cárdenas-Vázquez, R. (2008).** Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of ethnopharmacology*, 116(1), 27-32.
- Anthoni, C., Russell, J., Wood, K. C., Stokes, K. Y., Vowinkel, T., Kirchhofer, D., & AZZI, R. (2013).** Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuiers (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar (Doctoral dissertation, Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen ; 214).
- Baba Aissa F. (2011).** Encyclopédie des plantes utiles. Flore Méditerranéenne (Maghreb, Europe méridionale), Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. *El Maarifa*, 171.
- Bahorun, T. (1997).** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. AMAS. Food and agricultural research council. *Reduit. Mauritius*.

- Bailey, S. C., Brega, A. G., Crutchfield, T. M., Elasy, T., Herr, H., Kaphingst, K., & Schillinger, D. (2014).** Update on health literacy and diabetes. *The Diabetes Educator*, 40(5), 581-604.
- Basli, A., Chibane, M., Madani, K., & Oukil, N. (2012).** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10(1), 2-9.
- Bayır, H., Kagan, V. E., Borisenko, G. G., Tyurina, Y. Y., Janesko, K. L., Vagni, V. A., ... & Kochanek, P. M. (2005).** Enhanced oxidative stress in iNOS-deficient mice after traumatic brain injury: support for a neuroprotective role of iNOS. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 25(6), 673-684.
- Beddou, F. (2015).** *Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes Rumex vesicarius L. et Anvillea radiata Coss. & Dur. Coss & Dur.* (Doctoral dissertation, Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen; 164).
- Belouad A., 1998.** Plantes médicinales en Algérie. Office des publications nationale ; Algérie ,273.
- Benabed, K. H., (2018).** *Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles et extraits phénoliques de deux espèces de la famille des Lamiaceae* (Doctoral dissertation, Université Kasdi Merbah- Ouargla ; 126).
- Bénard, C. (2009).** *Étude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate* (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine, Université de NANCY).
- Bennetau-Pelissero, C. (2014).** Polyphénols et voies de signalisation, données récentes. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 49(4), 151-159.
- Benhmmou, N. (2011).** *Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien* (Doctoral dissertation, Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen ; 174).
- Ben, Mansour R., Gargouri, B., Gargouri, B., Elloumi, N., haj Jilani, I. B., Ghrabi-Bergogne-Bérézin, E., & Dellamonica, P. (Eds.). (1995).** Antibiothérapie en pratique clinique. *Ed. Masson, Paris.* 486p.
- Biyiti, L. F., Meko'o, D. J. L., Tamzc, V., & Amvam Zollo, P. H. (2004).** Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharm. Med. Trad. Afr*, 13, 11-20.

- Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felingera, A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217, 7972–7980.
- Bragazza, L., & Freeman, C. (2007).** High nitrogen availability reduces polyphenol content in Sphagnum peat. *Science of the Total Environment*, 377(2-3), 439-443.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> Ed Tec et Doc. Paris, P, 101-120.
- Boubekri, C. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra ; 210).
- Bouchouka, E. (2016).** Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar Annaba ; 126).
- Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012).** Effet antifongiques des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp* (Nepeta) briq. *Revue des Bio Ressources*, 2(1), 1-7.
- Bousoualim, N. (2014).** Activités biologiques de plantes médicinales : *Anchusa azurea* Mill et *Globularia alypum* L. Soutenue (Doctoral dissertation, Université Ferhat Abbas Sétif ; 136).
- Bousoualim, N., Trabsa hayat, Krache Iman, Arrar Lekhmissi, Baghiani Abderrahmane. (2016).** Kinetics of inhibition of xanthine oxidase by *globularia alypum* and its protective effect against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(04), 159-164.
- Boussoussa H. (2011).** Activités antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques des fleurs de *Rhanterium adpressum*, (Mémoire magister : valorisation et connaissance des produits naturels, Université Ammar Thelidji Laghouat ; 120).
- Boussoussa H. (2016).** Étude phytochimique et activités biochimiques des extraits phénoliques de l'espèce *Rhanterium adpressum*, (Doctoral dissertation, L'École Normale Supérieure de Kouba-Alger ; 185).
- Catier, O., & ROUX, D. (2007).** Botanique pharmacognosie phytothérapie. Paris 3<sup>é</sup> édition. Pp113. ISBN : N 2915585520.

- CHAIB, F. (2018).** *Contribution à l'étude des plantes sahariennes (Hoggar) : phytochimie et activités antioxydante et antibactérienne* (Doctoral dissertation, Université Ahmed Ben Bella Oran ; 165).
- Chambers H.F and Sande M.A (1998).** Médicaments antimicrobiens. In : Hardman J.G, Limbird L.E, Molinoff P.B, Rudon R.W and Gilman A.G. Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments. *New York: Mc Graw Hill*, 1027-1029.
- Chan, L. W., Cheah, E. L., Saw, C. L., Weng, W., & Heng, P. W. (2008).** Antimicrobial and antioxidant activities of Cortex Magnoliae Officinalis and some other medicinal plants commonly used in South-East Asia. *Chinese Medicine*, 3(1), 1-10.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
- Chehma, A., & Djebar, M. R. (2008).** Les espèces médicinales spontanées du Sahara septentrional algérien : distribution spatio-temporelle et étude ethnobotanique. *Synthèse : Revue des Sciences et de la Technologie*, 17, 36-45.
- Chen, I. C., CHANG, H. C., YANG, H. W., & CHEN, G. L. (2004).** Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and Chinese herbs: a fast approach with ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP system in microplates. *Journal of Food and Drug Analysis*, 12(1).
- Chethan, S., Sreerama, Y. N., & Malleshi, N. G. (2008).** Mode of inhibition of finger millet malt amylases by the millet phenolics. *Food Chemistry*, 111(1), 187-191.
- Chiasson, J. L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., & STOP-NIDDM Trial Research Group. (2003).** Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *Jama*, 290(4), 486-494.
- Chiba, S., Brewer, C. F., Okada, G., Matsui, H., & Hehre, E. J. (1988).** Stereochemical studies of D-glucal hydration by Alpha.-glucosidases and exo-Alpha.-glucanases: indications of plastic and conserved phases in catalysis by glycosylases. *Biochemistry*, 27(5), 1564-1569.
- Chograni, H., Riahi, L., Zaouali, Y., & Boussaid, M. (2013).** Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum L.* (G lobulariaceae). *African journal of ecology*, 51(2), 343-347.
- Choi, K. H., & Schweizer, H. P. (2006).** Mini-Tn 7 insertion in bacteria with single att Tn 7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature protocols*, 1(1), 153.

- Collin, G. J., Lord, D., Allaire, J., & Gagnon, D. (1991).** Huiles essentielles et extraits 'micro-ondes'. *Parfums, Cosmét. Arômes*, 97, 105-112.
- Cornwell, T., Cohick, W., & Raskin, I. (2004).** Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, 65(8), 995-1016.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., ... & Berghe, D. V. (1998).** Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural products*, 61(1), 71-76.
- Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Daglia, M. (2012).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Dangles, O., & Dufour, C. (2008).** Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health. *Recent advances in polyphenol research*, 1, 67-87.
- Das, K., Tiwari, R. K. S., & Shrivastava, D. K. (2010).** Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*, 4(2), 104-111.
- Dey, L., Attele, A. S., & Yuan, C. S. (2002).** Alternative therapies for type 2 diabetes. *Alternative medicine review*, 7(1), 45-58.
- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., & Kumar, S. (2017).** Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1193-S1199.
- Djabali, S., & Barkat, M. (2012).** Effet des extraits Polyphénoliques sur la résistance à l'infestation fongique dans le grain d'Haricot Sec, v. *Microbiol. Ind. San et Environn*, 6(2), 174-191.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97(4), 654-660.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J. M., & Stocker, P. (2010).** Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(10), 2599-2606.

- Es-Safi, N. E., Khlifi, S., Kollmann, A., Kerhoas, L., El Abbouyi, A., & Ducrot, P. H. (2006).** Iridoid glucosides from the aerial parts of *Globularia alypum L.* (Globulariaceae). *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 54(1), 85-88.
- Es-Safi, N. E., Kollmann, A., Khlifi, S., & Ducrot, P. H. (2007).** Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum L.* structure–activity relationship. *LWT-Food science and technology*, 40(7), 1246-1252.
- Es-Safi, N. E. (2012).** Plant polyphenols: Extraction, structural characterization, hemisynthesis and antioxidant properties. In *Phytochemicals as Nutraceuticals-Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. IntechOpen.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- Faller, A. L. K., & Fialho, E. F. N. U. (2010).** Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of food composition and analysis*, 23(6), 561-568.
- Fandohan, P., Gbenou, J. D., Gnonlonfin, B., Hell, K., Marasas, W. F., & Wingfield, M. J. (2004).** Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(22), 6824-6829.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.
- Fehri, B., Aiache, J. M., & Ahmed, K. M. (2012).** Active spermatogenesis induced by a reiterated administration of *Globularia alypum L.* aqueous leaf extract. *Pharmacognosy research*, 4(3), 138.
- Ferdjioui, S. (2018).** *Activités antioxydante et antimicrobienne des extraits méthanoliques et de l'huile essentielle de la plante mentha rotundifolia* (Doctoral dissertation, Université Ferhat Abbas Sétif ; 100).
- Ferrazzano, G. F., Roberto, L., Amato, I., Cantile, T., Sangianantoni, G., & Ingenito, A. (2011).** Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: an *in vivo* study. *Journal of medicinal food*, 14(9), 907-911.
- Fettah, A. (2019).** *Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique (antioxydante-antibactérienne) des extraits de la plante Teucrium polium L. sous espèce Thymoïdes de la région Beni Souik, Biskra* (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra ; 156).

- Gammar, Z., & Lassoued, S. (2012).** Investigation of antioxidant activity of alcoholic extract of *Globularia alypum L.* *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(25), 4193-4199.
- Garcia-Perez, M., Wang, S., Shen, J., Rhodes, M., Lee, W. J., & Li, C. Z. (2008).** Effects of temperature on the formation of lignin-derived oligomers during the fast pyrolysis of Mallee woody biomass. *Energy & Fuels*, 22(3), 2022-2032.
- Gebreyohannes, G., Moges, F., Sahile, S., & Raja, N. (2013).** Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian pacific journal of Tropical biomedicine*, 3(6), 426-435.
- Gérard, J. (2005).** MODY types of diabetes mellitus. *Revue médicale de Liege*, 60(5-6), 439-441.
- Gerrard, J. A., Prince, M. J., & Abell, A. D. (2000).** Kinetic characterisation of ene-diol-based inhibitors of  $\alpha$ -amylase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 10(14), 1575-1576.
- Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- Ghnimi, W. (2015).** *Étude phytochimique des extraits de deux Euphorbiaceae : Ricinus communis et Jatropha curcas. Évaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine ; 244).
- Giner- Chavez, B.I., 1996.** Condensed tannins in tropical forages. These Ph. D, Cornell University, Ithaca, USA.
- Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234.
- Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M., & Dangles, O. (2003).** Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 615-622.
- Granger, D. N. (2007).** Tissue factor: a mediator of inflammatory cell recruitment, tissue injury, and thrombus formation in experimental colitis. *The Journal of experimental medicine*, 204(7), 1595-1601.
- Gupta, S. D. (Ed.). (2010).** *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants.* CRC press, 362p.

- Hailu T, Endris M, Kaleab A, Tsige GM. (2005).** Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 168-175.
- Halimi, S. (2005).** Nouvelles stratégies thérapeutiques dans le diabète de type 2. *La Presse Médicale*, 34(18), 1287-1292.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Harper, W., Clement, M., Goldenberg, R., Hanna, A., Main, A., Retnakaran, R., & Yale, J. F. (2013).** Pharmacologic management of type 2 diabetes. *Canadian Journal of Diabetes*, 37, S61-S68.
- Harzallah, H. J., Neffati, A., SK, I., Maaloul, E., Chekir-Ghedira, L., & Mahjoub, T. (2010).** Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts. *Journal of medicinal plants research*, 4(19), 2048-2053.
- Jensen R., (2002).** Clinical Presentation of Arterial Thrombosis vs. Venous Thrombosis. *Clinical Hemostasis Review*. 16(8), 1-6.
- Jouad, H., Maghrani, M., & Eddouks, M. (2002).** Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus L.* and *Globularia alypum L.* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(3), 351-356.
- Kada, S. (2018).** *Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques* (Doctoral dissertation, Université Ferhat Abbas Sétif ; 172).
- Karam J.H. (2007).** *Pancreatic hormones and antidiabetic drugs*. New York, USA, the McGraw-Hill Companies, Inc.
- Karataş, H., Uyar, F., Tolan, V., & Baysal, Z. (2013).** Optimization and enhanced production of  $\alpha$ -amylase and protease by a newly isolated *Bacillus licheniformis* ZB-05 under solid-state fermentation. *Annals of Microbiology*, 63(1), 45-52.
- Keillor, J.W. (2004).** *Enzymologie inhibition des réactions enzymatiques*, Université de Montréal, faculté des arts et des sciences, département de chimie 6-19.
- Khacheba, I., Djeridane, A., & Yousfi, M. (2014).** Twenty traditional Algerian plants used in diabetes therapy as strong inhibitors of  $\alpha$ -amylase activity. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2014.
- Khacheba, I., Djeridane, A., Kameli, A., & Yousfi, M. (2014).** The Inhibitory Effect of Some Algerian Plants Phenolics Extracts on the  $\alpha$  – glucosidase and  $\alpha$ -amylase Activities and Their Antioxidant Activities. *Current Enzyme Inhibition*, 10 (1), 58-67.

- Khacheba, I., (2014).** *Evaluation de l'activité antioxydante et étude du pouvoir d'inhibition sur l' $\alpha$  - amylase et l' $\alpha$  – glucosidase des extraits naturels de la plante Genista.* (Doctoral dissertation, L'École Normale Supérieure de Kouba-Alger; 255)
- Khacheba, I., Boussoussa, H., Djeridane, A., Bekhaoua, A., Bensayah, N., & Yousfi, M. (2017).**  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect and antioxidant activity of the extracts of eighteen plant traditionally used in Algeria for diabetes. *Current Enzyme Inhibition*, 13(1), 67-78.
- Khaldi, A., Meddah, B., Moussaoui, A., Benmehdi, H., & Gouri, S. (2012).** Screening phytochimique et effet antifongique de certains extraits de plantes sur le développement *in vitro* des moisissures. *European Journal of Scientific Research*, 80(3), 311-321.
- Khanal, P., & Patil, B. M. (2019).** Gene set enrichment analysis of alpha-glucosidase inhibitors from *Ficus benghalensis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 9(6), 263.
- Khelifi, D., Hamdi, M., Hayouni, A. E., Cazaux, S., Souchard, J. P., Couderc, F., & Bouajila, J. (2011).** Global chemical composition and antioxidant and anti-tuberculosis activities of various extracts of *Globularia alypum L.* (Globulariaceae) leaves. *Molecules*, 16(12), 10592-10603.
- 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 Journal of Pharmacology*, 37(4), 227.
- Kim, S. H., Jun, C. D., Suk, K., Choi, B. J., Lim, H., Park, S., ... & Shin, T. Y. (2006).** Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicological Sciences*, 91(1), 123-131.
- Kirakosyan, A. (2006).** Plant biotechnology for the production of natural products. *Natural products from plants*, 221-262.
- Krimat, S., Tahar, D., Lynda, L., Saida, B., Chabane, C., & Hafidha, M. (2014).** Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(6), 478-483.
- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2011).**  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plants : A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy reviews*, 5(9), 19.
- Kumar, N., Puri, N., Marotta, F., Dhewa, T., Calabrò, S., Puniya, M., & Carter, J. (2017).** Diabetes: an epidemic with its causes, prevention and control with special focus on dietary regime. *Functional Foods in Health and Disease*, 7(1), 1-16.

- Kuzuya, T., Nakagawa, S., Satoh, J., Kanazawa, Y., Iwamoto, Y., Kobayashi, M., & Committee of the Japan Diabetes Society on the Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. (2002).** Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*, 55(1), 65-85.
- Kwon, Y. I., Apostolidis, E., Kim, Y. C., & Shetty, K. (2007).** Health benefits of traditional corn, beans, and pumpkin: *in vitro* studies for hyperglycemia and hypertension management. *Journal of medicinal food*, 10(2), 266-275.
- Lafka, T. I., Sinanoglou, V., & Lazos, E. S. (2007).** On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food chemistry*, 104(3), 1206-1214.
- Lebovitz, H. E. (1997).** Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 26(3), 539-551.
- Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004).** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 21-33.
- Leporatti, M. L., & Ghedira, K. (2009).** Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 5(1), 1-8.
- Lévêque, E., Janeček, Š., Haye, B., & Belarbi, A. (2000).** Thermophilic archaeal amyolytic enzymes. *Enzyme and microbial technology*, 26(1), 3-14.
- Lebovitz, H. E. (1998).**  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors as agents in the treatment of diabetes. *Diabetes Rev*, 6, 132-145.
- Liu, W., Liu, J., Yin, D., & Zhao, X. (2015).** Influence of ecological factors on the production of active substances in the anti-cancer plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) TS Ying. *PLoS one*, 10(4), e0122981.
- Loh, S. P., & Hadira, O. (2011).** *In vitro* inhibitory potential of selected Malaysian plants against key enzymes involved in hyperglycemia and hypertension. *Malays J Nutr*, 17(1), 77-86.
- Lopez, M., Martinez, F., Del Valle, C., Ferrit, M., & Luque, R. (2003).** Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method. *Talanta*, 60(2-3), 609-616.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*.
- Madi, A., (2018).** *Caractérisation phytochimique et évaluation des activités biologiques de Cleome arabica* (Doctoral dissertation, Université Des Frères Mentouri Constantine ; 157).

- Manallah, A. (2012).** *Activités antioxydant et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive* (Mémoire de magister, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie ; 132).
- Marfak, A. (2003).** *Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides.* Université de LIMOGES.
- Markham, K. R. (1982).** *Techniques of flavonoid identification* (Vol. 36). London: Academic press, 347.
- Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque Et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie, 51, 304–315.*
- Massebceuf, N., & Sachon, C. (2004).** Type 1 diabetes, patient-centered insulin therapy. *Soins ; la revue de reference infirmiere, (686 Pt1), 23-25.*
- Maugendre, D., Yaouanq, J., Guilhem, I., Campion, L., Lorcy, Y., Leguerrier, A. M., & Allannic, H. (2007).** Etiologie et physiopathologie des diabètes secondaires. *Encyclopédie Médico-chirurgicale. Endocrinologie-Nutrition. Editions scientifiques et médicales, Elsevier Masson SAS, 10-366.*
- McCue, P. P., & Shetty, K. (2004).** Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase *in vitro*. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 13(1).*
- Mena, S., Ortega, A., & Estrela, J. M. (2009).** Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 674(1-2), 36-44.*
- Michel, T., Destandau, E., & Elfakir, C. (2011).** Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides L.*) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction. *Food Chemistry, 126(3), 1380-1386.*
- Mojab, F., Kamalinejad, M., Ghaderi, N., & Vahidipour, H. R. (2003).** Phytochemical Screening of Some Species of Iranian Plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 77, 82.*
- Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol, 26(2), 211-219.*
- Mondiale de la Santé, O. (2016).** *Commercialisation des substituts du lait maternel : mise en oeuvre du code international à l'échelle nationale : rapport de situation 2016 : résumé* (No. WHO/NMH/NHD/16.1). Organisation mondiale de la Santé.

- Monnier, L., Colette, C., Mas, E., Michel, F., Cristol, J. P., Boegner, C., & Owens, D. R. (2010).** Regulation of oxidative stress by glycaemic control: evidence for an independent inhibitory effect of insulin therapy. *Diabetologia*, 53(3), 562-571.
- Muanda, F. N. (2010).** *Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques.* (Doctoral dissertation, Ecole doctorale Sesames Université Paul Verlaine-Metz, 294).
- Muhammad Jihad, S. (2018).** *Formulation of Momordica charantia fruit and Syzygium polyanthum leaf extracts based on in vitro antioxidant and inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase/Muhammad Jihad Sandikapura* (Doctoral dissertation, University of Malaya).
- Mukherjee, P. K., Maiti, K., Mukherjee, K., & Houghton, P. J. (2006).** Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *Journal of ethnopharmacology*, 106(1), 1-28.
- MuKherjee, S., SharMaSarKar, B., DaS, K. K., Bhattacharyya, A., & Deb, A. (2013).** Compliance to anti-diabetic drugs: observations from the diabetic clinic of a medical college in kolkata, India. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 7(4), 661.
- Nabavi, S. M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., & Nabavi, S. F. (2015).** Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food chemistry*, 173, 339-347.
- Nadeem AS, Mohd M, N.Abdul K & Mohd A. (2010).** Evaluation of antioxidant activity, quantitative estimation of phenols and flavonoids in different parts of *Aeglemarmelos*, *African Journal of Plant Science*, 1–5.
- Naik, N., Sharath, V., Vijay kumar, H., Swetha, H. (2013).** Synthesis and *In Vitro* Antioxidant Evaluation of Some Indole-2-carboxylic Acid-Aryl Amine Conjugates. *Chemical Science Transactions*, 2 (1), 113 – 122.
- Nistor, L. A. (2010).** Inhibition de l'absorption intestinale du glucose par les produits naturels issus de la pharmacopée traditionnelle des Cris de la Baie James.
- Nkhili, E. Z. (2009).** *Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant.* (Doctoral dissertation, Université Cadi Ayyad-Marrakech; 378).
- Novelli, G. P. (1997).** Role of free radicals in septic shock. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 48(4), 517-527.
- Ozcan, T., Akpınar-Bayızit, A., Yılmaz-Ersan, L., & Delikanlı, B. (2014).** Phenolics in human health. *International Journal of chemical engineering and applications*, 5(5), 393.

- Ozenda, P. (1991).** *Flora and vegetation of the Sahara*. CNRS.
- Pham, T. N. (2016).** *Recherche de nouveaux inhibiteurs d'arginase, d'origine naturelle et hémisynthétique, inspirés de l'acide chlorogénique et du picéatannol* (Doctoral dissertation, Université de Franche-Comté ; 269).
- Pinelo, M., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2004).** Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 88(2), 201-207.
- Pirosa, E. A., Grósz, A., Kis, J. T., Schandl, L., & Kautzky, L. (2019).** A Study Assessing an Injection Port of Administration of Insulin. *Endocrinol Diabetes Res* 5: 1. of, 4, 3-5.
- Portes, E. (2008).** *Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes : propriétés photochimiques et antioxydantes : applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle* (Doctoral dissertation, Bordeaux 1).
- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., & Trotin, F. (2000).** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology*, 72(1-2), 35-42.
- Quezel, P., & Santa, S. (1963).** *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* (No. 581.965 Q8).
- Ramzi, M. A., Abdo, S. A., Hasson, S., Althawab, F., Alaghbari, S. A., & Lindequist, U. (2010).** Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. *Evidence-based Complementary and alternative medicine*, 7(3), 323-330.
- Raquibul, S. M., H., Mokarram, Md. H., Raushanara, A., Mariam, J., Ehsanul, Md. H. M and Shafiqur, Rahman., November.(2009).** DPPH free radical scavenging activity of some Bangladeshi medicinal plants. *Journal of Medicinal plants research*, 3(11), 875-879.
- Raza, W., Yuan, J., Ling, N., Huang, Q., & Shen, Q. (2015).** Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum. *Biological Control*, 80, 89-95.
- Reddy, P. P., Tiwari, A. K., Rao, R. R., Madhusudhana, K., Rao, V. R. S., Ali, A. Z., ... & Rao, J. M. (2009).** New Labdane diterpenes as intestinal  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from antihyperglycemic extract of *Hedychium spicatum* (Ham. Ex Smith) rhizomes. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(9), 2562-2565.

- Rhabasa-Lhoret, R., & Chiasson, J. L. (2004).** G-Glucosidase Inhibitors. *International Textbook of Diabetes Mellitus, 3rd Edn., DeFronzo, RA, E. Ferrannini, H. Keen and P. Zimmet (Eds.). John Wiley and Sons, London, UK, 901-914.*
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., & Blázquez, J. (2013).** Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology, 303(6-7), 293-297.*
- Saffidine, K. (2015).** *Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de carthamus caeruleus L. et de plantago major L* (Doctoral dissertation, Université Ferhat Abbas Sétif ; 132).
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 76(2), 270-276.*
- Sarma, C. J. (2011).** Naturally occurring polyphenols and their utility. *Chemistry of phenolic compounds: state of the art, 19-30.*
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E., & Kakuda, Y. (2003).** Polyphenolics in grape seeds—biochemistry and functionality. *Journal of medicinal food, 6(4), 291-299.*
- Shimizu, H., Kiyohara, Y., Kato, I., Kitazono, T., Tanizaki, Y., Kubo, M., & Iida, M. (2004).** Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke, 35(9), 2072-2077.*
- Shirzad, H., Hassani, A., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Finidokht, R., & Meshkatalasadat, M. H. (2011).** Assessment of the antifungal activity of natural compounds to reduce postharvest gray mould (*Botrytis cinerea* pers.: Fr.) of kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) during storage. *Journal of Plant Protection Research, 51(1), 1.*
- Shobana, S., Sreerama, Y. N., & Malleshi, N. G. (2009).** Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana L.*) seed coat phenolics: Mode of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry, 115(4), 1268-1273.*
- Sivananthan, M. (2013).** Antibacterial activity of 50 medicinal plants used in folk medicine. *Int J Biosci, 3(4), 104-21.*
- Slama-Chaudhry, A., Mavromati, M., & Golay, A. (2013).** Diabete type II. *Hopitaux Universitaires de Geneve (HUG), Geneve.adical quenching techniques. Journal of Food Composition and Analysis, 23(6), 545-553.*
- Smaga, I., Niedzielska, E., Gawlik, M., Moniczewski, A., Krzek, J., Przegaliński, E., & Filip, M. (2015).** Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target

of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacological Reports*, 67(3), 569-580.

**SINGH, S., GARG, V., YADAV, D., BEG, M. N., & SHARMA, N (2012).** *In vitro* antioxidative and antibacterial activities of various parts of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 468-473.

**Small, E., & Catling, P. M. (2000).** *Canadian medicinal crops*. NRC Research Press.

**Surmaghi, M. S., Amin, Y. A. G., & Mahmoodi, Z. (1992).** Survey of Iranian plants for saponins alkaloids flavonoids and tannins. IV. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2-3), 1-11.

**Taghzouti, O. K., Balourib, M., Ouedrhiric, W., Chahadd, A. E., & Romanaea, A. (2016).** *In vitro* evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of *Globularia alypum L.* extracts. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7, 1988-1995.

**Takwi, A. A., Li, Y., Becker Buscaglia, L. E., Zhang, J., Choudhury, S., Park, A. K., ... & Li, Y. (2012).** A statin-regulated microRNA represses human c-Myc expression and function. *EMBO molecular medicine*, 4(9), 896-909.

**Tan, K., & Pillon, F. (2009).** Les incrétones, une nouvelle stratégie pour traiter le diabète de type 2. *Actualités pharmaceutiques*, 481(48), 21-22.

**Tatsadjieu, L. N., Ngassoum, M. B., Nukenine, E. N., Mbawala, A., & Yaouba, A. (2007).** Antifungal and anti-insect activities of three essential oils on *Aspergillus flavus* Link and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Natural Product Communications*, 2(12), 1934578X0700201220.

**Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011).** Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica scientia*, 1(1), 98-106.

**Tossou, K., Sess, D., & Adran, A. (1995).** Intérêt et place de la médecine traditionnelle dans le traitement du diabète sucré. Résultats préliminaires. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine*, CAMES, 19-28.

**Touafek, O. (2010).** *Etude phytochimique de plantes médicinales du Nord et du Sud algériens*. (Doctoral dissertation, Université Des Frères Mentouri Constantine ; 282).

**Touaibia, M., & Chaouch, F. Z. (2016).** Global chemical composition and antioxidative effect of the ethanol extracts prepared from *Globularia alypum* leaves. *Nature & Technology*, (14), 2.

**Ulanowska, K., Tkaczyk, A., Konopa, G., & Węgrzyn, G. (2006).** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Archives of microbiology*, 184(5), 271-278.

- Valle Jr, D. L., Andrade, J. I., Puzon, J. J. M., Cabrera, E. C., & Rivera, W. L. (2015).** Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 5(7), 532-540.
- Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1996).** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331-342.
- Van De Laar, F. A., Lucassen, P. L., Akkermans, R. P., Van De Lisdonk, E. H., Rutten, G. E., & Van Weel, C. (2005).**  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes : results from a Cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes care*, 28(1), 154-163.
- Velu, Henri. "Turpin (R.) et Velu (H.). (1957).** Thérapeutique antibiotique." *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 110 (6), 261-263.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2007).** *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- Vongsak, B., Kongkiatpaiboon, S., Jaisamut, S., Machana, S., & Pattarapanich, C. (2015).** *In vitro* alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(5), 445-450.
- Wang, S. & Wu, J., Shi, S., Wang, H., (2016).** Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes: A review. *Carbohydrate polymers*, 144, 474-494.
- Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C., & Shaw, J. (2011).** IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*, 94(3), 311-321.
- Winkel-Shirley, B. (2002).** Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 218-223.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007).** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949.
- Xiao, L., Huang, D. S., Tong, J. J., & Shen, J. (2012).** Efficacy of endoluminal interventional therapy in diabetic peripheral arterial occlusive disease: a retrospective trial. *Cardiovascular diabetology*, 11(1), 1-11.
- Zerriouh, M. (2008).** *Contribution à l'étude de l'activité antidiabétique de la globularine, un iridoïde isolé des feuilles de Globularia alypum L. chez le rat Wistar* (Doctoral dissertation, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen ; 138).

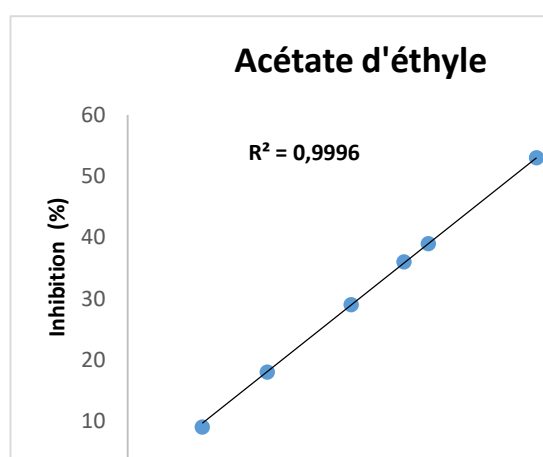
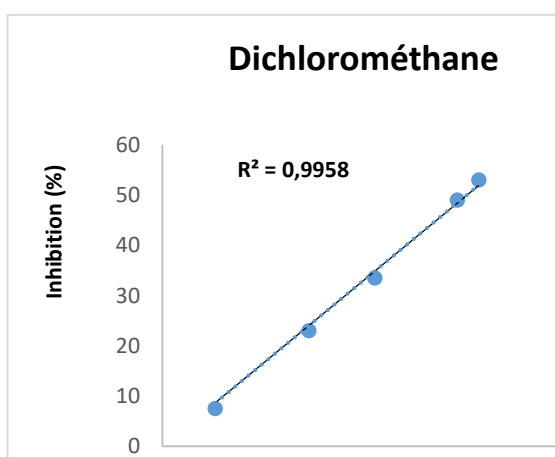
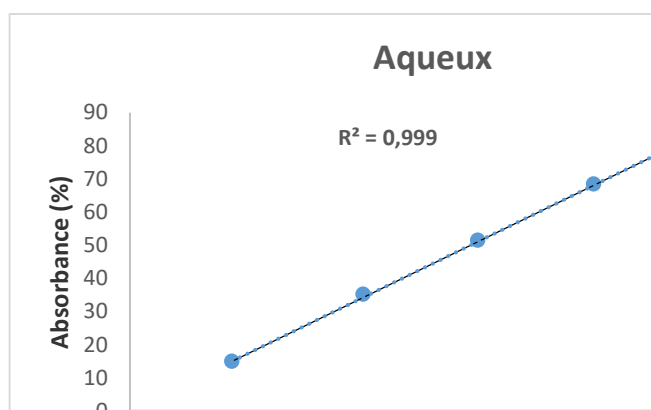
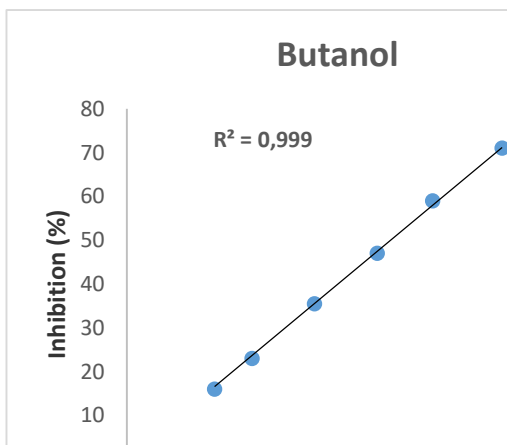
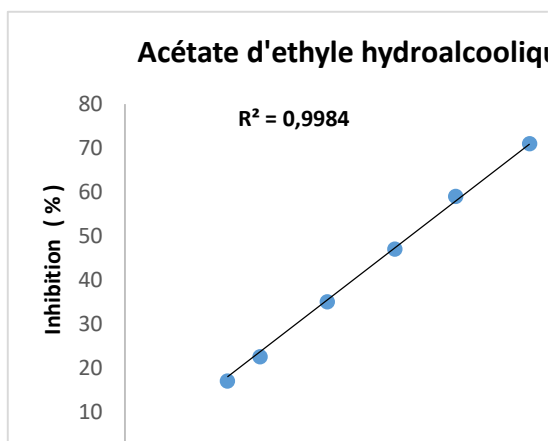
**Zlotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M., & Świeca, M. (2016).** The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum L.*) extracts. *Saudi journal of biological sciences*, 23(5), 628-633.

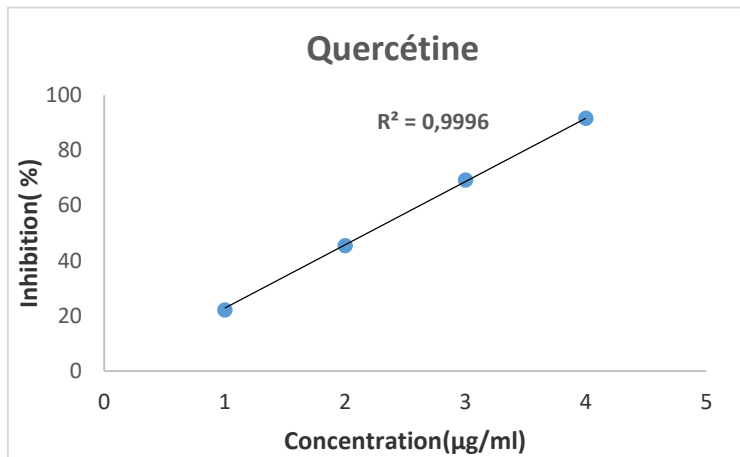
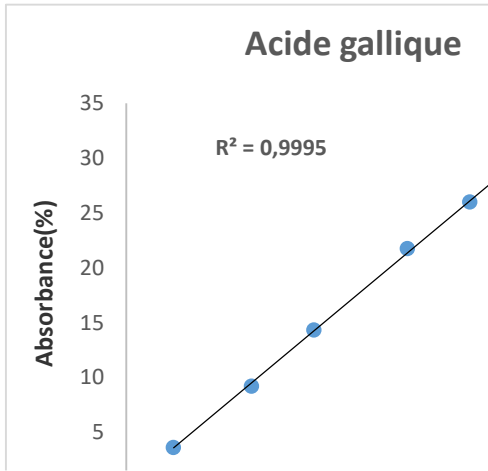
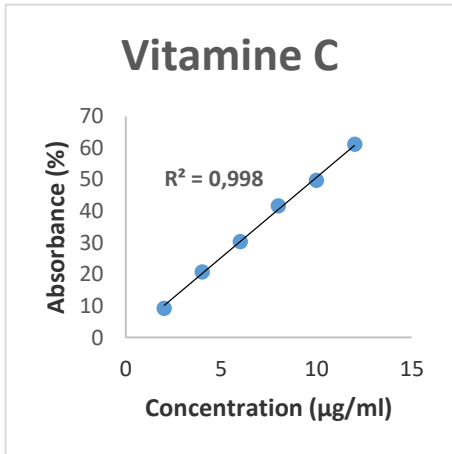
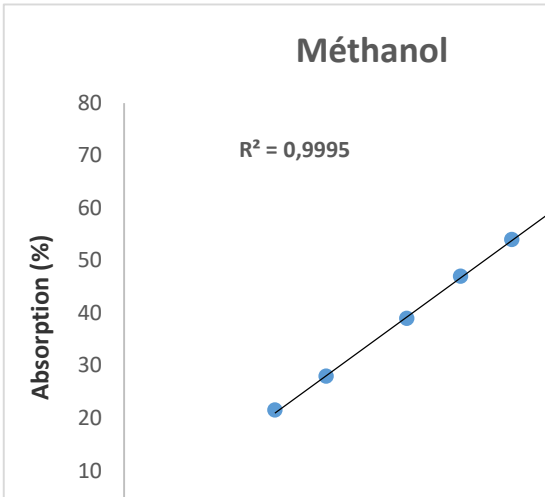
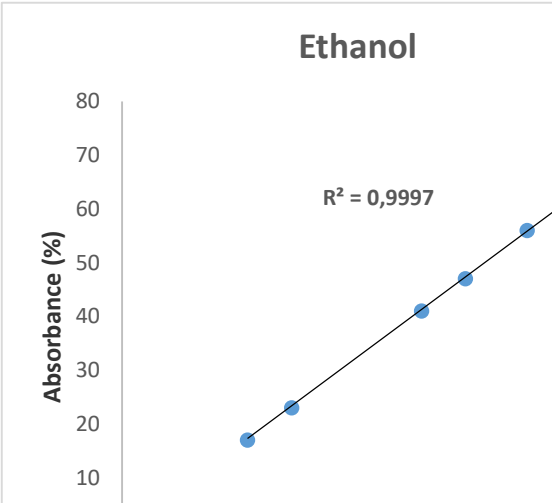
**Zoubiri, L. (2001).** Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes (Mémoire magister, Université Mentouri Constantine ; 104).

# **Annexes**

## Annexe 1

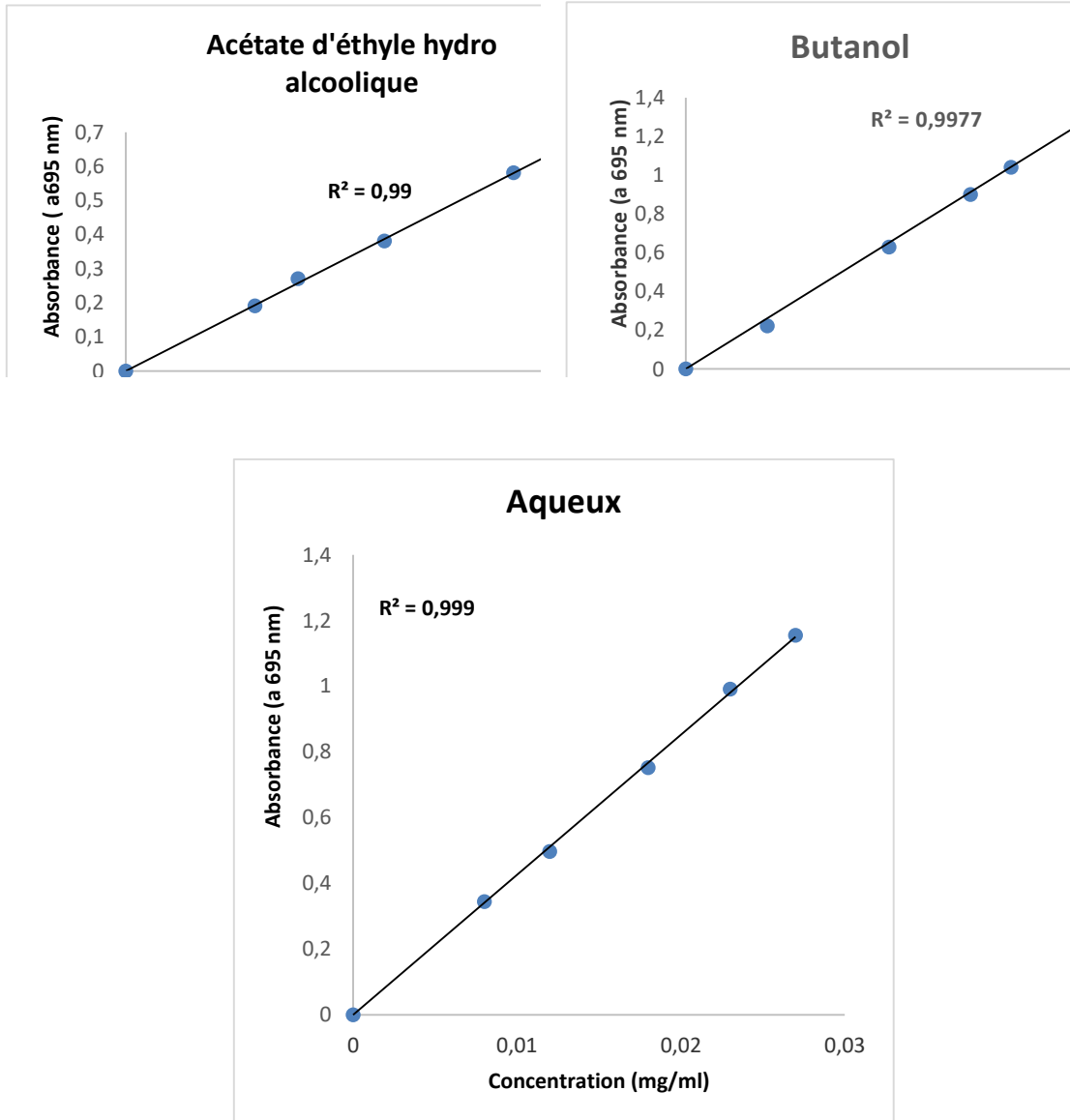
Les représentations graphiques ( $I\% = f(C)$ ) du test de DPPH des extraits végétaux et des antioxydants standards (vitamine C, Quercétine, Acide gallique).

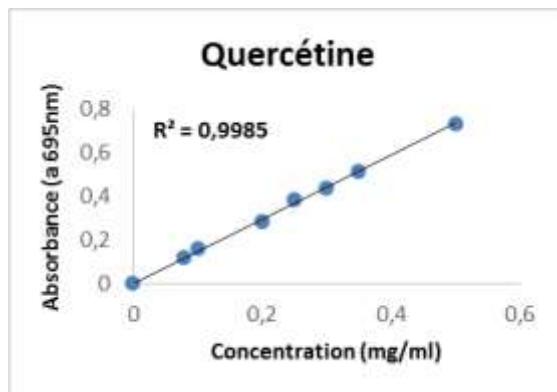
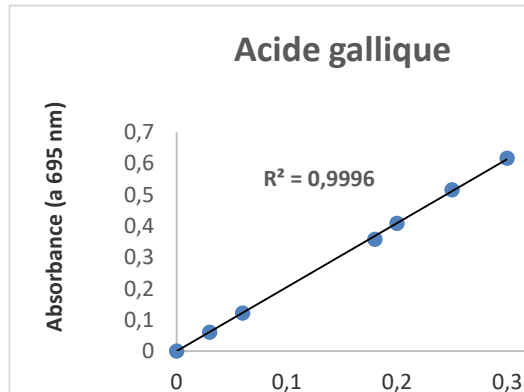
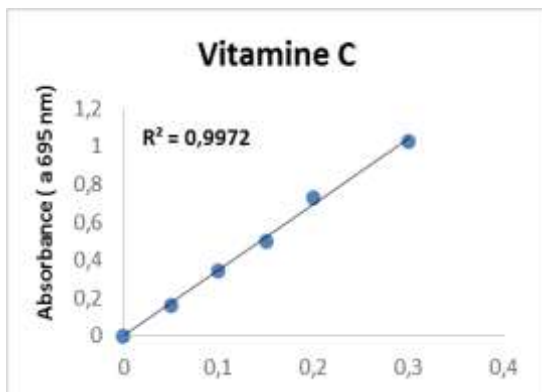
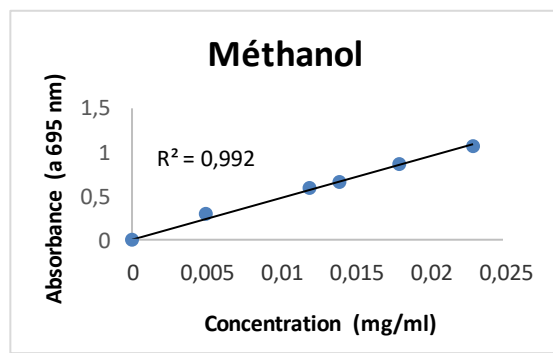
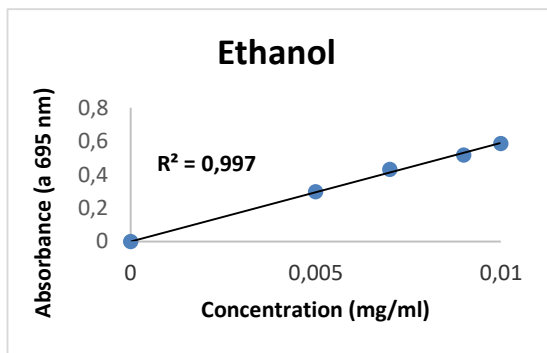
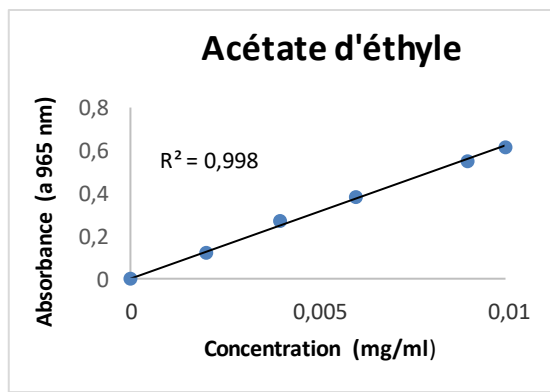
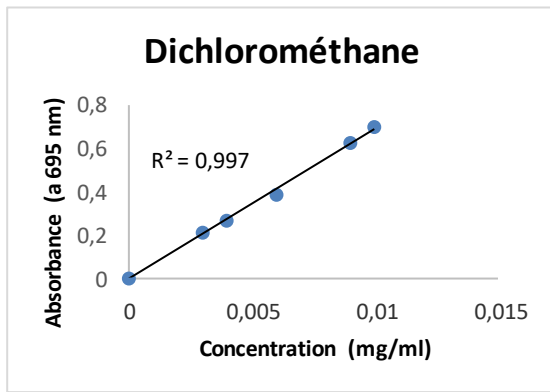




## Annexe 2 :

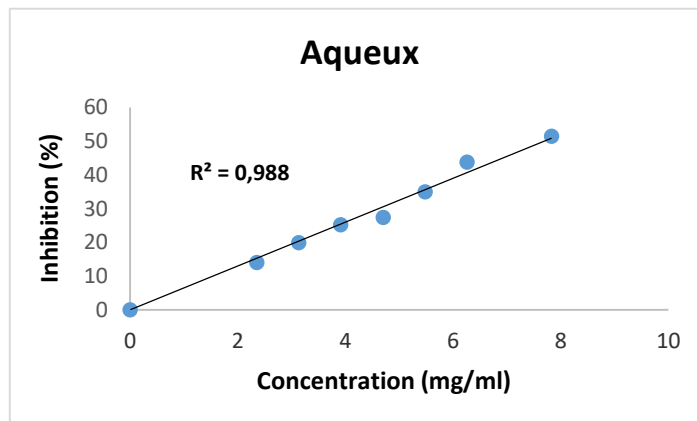
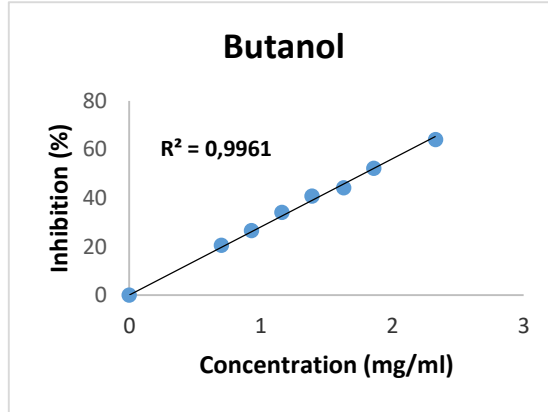
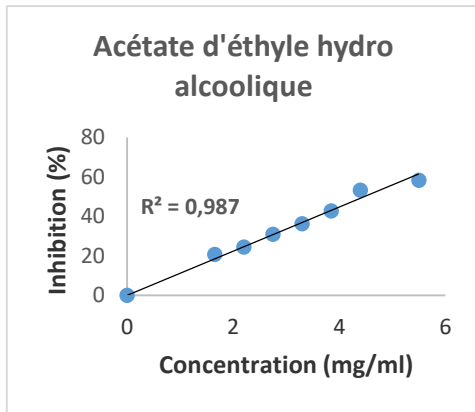
Les représentations graphiques du test de Molybdate  $I\% = f(C)$  des extraits végétaux et des standards.



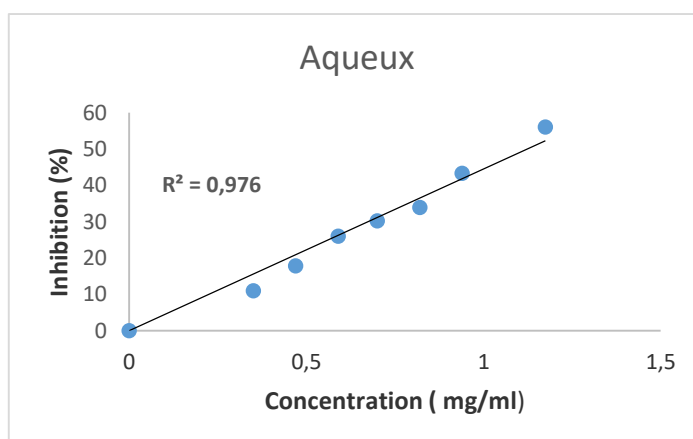
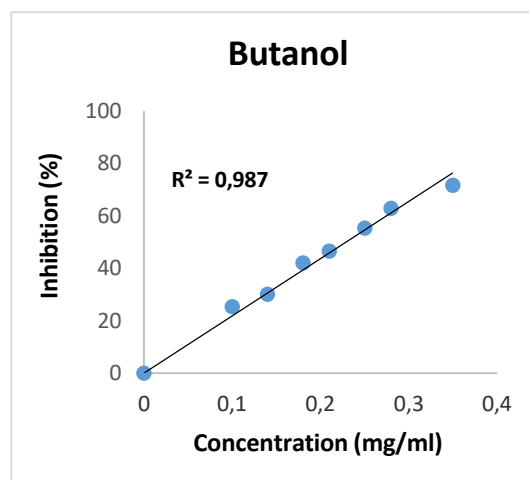
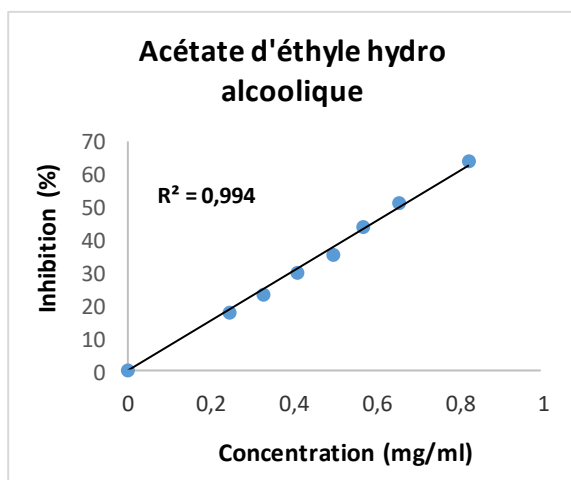


### Annexe 3

I-Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase en fonction de la concentration des trois extraits choisis de *Globularia alypum L*



II-Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase en fonction de la concentration des trois extraits choisis de *Globularia alypum*



## Annexe 4

Effet des extrais phénolique de *Globularia alypum L* sur la croissance des moisissures

(Diamètre moyen  $\pm$  écart type en mm)

Souches	Zones d'inhibition des micro-organismes testés (mm)									
	T (Témoin)	Acétate d'éthyle			Butanol			Aqueux		
	0	50 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml
<i>Aspergillus flavus</i>	66 $\pm$ 0,0	45 $\pm$ 1,3	40 $\pm$ 0,8	37 $\pm$ 2,6	47 $\pm$ 0,4	43 $\pm$ 0,7	41 $\pm$ 1,4	66 $\pm$ 0,2	66 $\pm$ 0,6	66 $\pm$ 1,4
<i>Penicillium spp</i>	46 $\pm$ 1.2	26 $\pm$ 1,0	22 $\pm$ 1,6	19 $\pm$ 2,2	29 $\pm$ 0,8	25 $\pm$ 0,4	24 $\pm$ 1,3	46 $\pm$ 1,7	46 $\pm$ 2,4	46 $\pm$ 1,4
<i>Fusarium oxysporum</i>	72 $\pm$ 0.6	38 $\pm$ 2,1	30 $\pm$ 1,5	24 $\pm$ 1,1	45 $\pm$ 0,8	40 $\pm$ 1,3	35 $\pm$ 0,5	63,2 $\pm$ 2,3	60 $\pm$ 1,6	57.8 $\pm$ 1,3

## **Annexe 5**

### Composition des milieux de culture

#### **Milieu MH**

Extrait de viande de boeuf : 2.0g ;

Peptone de caséine : 17.5g ;

Amidon de maïs : 1.5g ;

Agar: 17.0g

PH: 7.4.

#### **Milieu PDA**

Extrait de pomme de terre : 1000ml

Extrait de pomme de terre : 1000ml

Dextrose : 20g

Agar: 20g