



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
قسم العلوم البيولوجية.

Département des Sciences biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

**Etude phytochimique et évaluation des propriétés
antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de *Globularia
alypum* et *Retama sphaerocarpa***

Présenté par : KSOURI Hasna

MAOUCHE Nihad

Soutenu le : 14/07/2021 Devant le jury :

Président : M^{me} BOUMERFEG Sabah Pr (Univ. de Mohamed El Bachir El Ibrahimi. B.B.A.)

Encadrant : M^r BELLIK Yuva MCA (Univ. de Mohamed El Bachir El Ibrahimi. B.B.A.)

Examineur : M^r TOUATI Noureddine MCA (Univ. de Mohamed El Bachir El Ibrahimi. B.B.A.)

Année universitaire : 2020/2021

REMERCIEMENTS

En premier lieu, nous tenons à remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la foi et de nous avoir permis d'en arriver là.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à M^r BELLIK Yuva, pour avoir accepté de nous encadrer, pour ses précieux conseils et encouragements.

Nous remercions les membres de jury M^{me} BOUMERFEG S d'avoir accepté de présider le jury et M^r TOUATI N. d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Ainsi, nous adressons nos remerciements aux ingénieurs de laboratoire au niveau de l'université de Bordj Bou Arreridj pour leur aide. En fin, nous remercions tous les enseignants de la faculté SNV et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

*A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie
A mon père, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes
études*

*J'espère que, du monde qui s'en maintient, il apprécie cet humble geste
comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié
pour son âme*

A ma très chère mère

*Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la
bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement
qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

A mes très chères sœurs

A mes chères amies

Hasna

DEDICACES

Louange à ALLAH, Seigneur de l'univers

*A l'âme de ma GRAND-MÈRE décédée qui m'a toujours
contenu dans ses prières*

*A mes chers PARENTS qui ont toujours été à mes côtés et ont
cru en moi et en tous mes rêves*

A mon frère unique

A mes sœurs

A toute ma famille

A tous mes enseignants de mon parcours

A tous mes amis et mes collègues

A tous mes élèves

*A toute personne qui s'efforce de se développer ses compétences
et ses connaissances*

MAOUCHE Nihad

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
CHAPITRE.I. MATERIEL ET METHODES	04
I.1. Matériel végétal	04
I.1.1. Description botanique et systématique de <i>Globularia alypum</i>	04
I.1.2. Description botanique et systématique de <i>Retama sphaerocarpa</i>	05
I.2. Récolte	06
I.3.Séchage, broyage et tamisage	06
I.4. Etude physicochimique	07
I.4.1. Détermination du taux d'humidité	07
I.4.2. Détermination du taux de cendre	08
I.4.3. Teneur en matière lipidique	08
I.5. Etude phytochimique	09
I.5.1. Préparation des extraits	09
I.5.2. Détermination du rendement d'extraction	10
I.5.3. Dosage des composées phénoliques totaux	10
I.5.4. Dosage de la teneur en flavonoïdes	10
I.5.5. Dosage des tanins condensés (Pro-anthocyanidines)	11
I.5.6. Dosage des caroténoïdes	11
I.5.7. Dosage des pigments liposolubles	12
I.6. Évaluation de l'activité antioxydante	13
I.6.1. Dosage de l'activité anti-radicalaire (test DPPH)	13
I.6.2. Pouvoir réducteur	13
I.6.3. Capacité antioxydant totale	14
I.7. Évaluation de l'activité antimicrobienne	14
I.8. Analyse statistique	16
CHAPITRE.II. RESULTATS ET DISCUSSION	17
II.1. Résultats de l'étude physicochimique	17
II.1.1. Taux d'humidité des feuilles fraîches	17

II.1.2. Taux d'humidité de la poudre	17
II.1.3. Taux de cendre	18
II.1.4. Teneur en matière grasse	18
II.2. Résultats de l'étude phytochimique	19
II.2.1. Rendements d'extraction	19
II.2.2. Teneurs en polyphénols totaux	20
II.2.3. Teneurs en flavonoïdes totaux	21
II.2.4. Teneurs en tanins condensés	22
II.2.5. Teneurs en caroténoïdes	23
II.2.6. Teneurs en pigments chlorophylliens	23
II.3. Activité antioxydante	25
II.3.1. Activité scavenger à l'égard du radical libre DPPH	25
II.3.2. Pouvoir réducteur	26
II.3.3. Capacité antioxydant totale	27
II.4. Activité antimicrobienne	28
Conclusion	31
Références bibliographiques	
Annexe	
Résumé	

LISTE DES ABREVIATIONS

ERO : Espèces réactives oxygénées

DPPH : 2,2- diphényle-1-picrylhydrazyl

CAT : Capacité antioxydant totale

BHA : Butylhydroxyanisole

BHT : Butylhydroxytoluène

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

EAG : équivalent acide gallique

EQ : équivalent quercétine

EC : équivalent catéchine

E β-C: équivalent β-carotène

K₃Fe(CN)₆: Ferricyanure de potassium

FeCl₃ : Chlorure ferrique

MeOH : Méthanol

EtOH : Ethanol

EtOAc : Acétate d'éthyle

Vit C : Vitamine C

GEN : Gentamicine

DMF : Diméthylformamide

HCL : Acide chlorhydrique

MS : Matière sèche

ES : Extrait sec

Liste des figures

Figure 1 : Photographie originale de l'espèce <i>Globularia alypum</i> L.	5
Figure 2 : Photographie originale de l'espèce <i>Retama sphaerocarpa</i> .	6
Figure 3 : Teneurs en eau de <i>Globularia alypum</i> et de <i>Retama sphaerocarpa</i> .	17
Figure 4 : Taux d'humidité des poudres de <i>Globularia alypum</i> et de <i>Retama sphaerocarpa</i> .	17
Figure 5 : Taux de cendre de <i>Globularia alypum</i> et de <i>Retama sphaerocarpa</i> .	18
Figure 6 : Teneur en matière grasse de <i>Globularia alypum</i> et de <i>Retama sphaerocarpa</i> .	18
Figure 7 : Histogrammes montrant le rendement d'extraction de <i>Globularia alypum</i> et de <i>Retama sphaerocarpa</i> .	19
Figure 8 : Histogrammes montrant les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de <i>Globularia alypum</i> et de <i>Retama sphaerocarpa</i> .	20
Figure 9 : Histogrammes montrant les teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits de <i>Globularia alypum</i> et de <i>Retama sphaerocarpa</i> .	22
Figure 10 : Histogrammes montrant les teneurs en tanins condensés des différents extraits de <i>Globularia alypum</i> et de <i>Retama sphaerocarpa</i> .	23
Figure 11 : Histogrammes montrant l'activité scavenger des différents extraits de <i>Globularia alypum</i> et de <i>Retama sphaerocarpa</i> à l'égard du radical DPPH.	25
Figure 12 : Histogrammes montrant le pouvoir réducteur des différents extraits de <i>Globularia alypum</i> et de <i>Retama sphaerocarpa</i> .	27
Figure 13 : Histogrammes montrant la capacité antioxydante totale des différents extraits de <i>Globularia alypum</i> et de <i>Retama sphaerocarpa</i> .	28

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification botanique de <i>Globularia alypum</i>	4
Tableau 2 : Classification botanique de <i>Retama sphaerocarpa</i>	5
Tableau 3 : Teneur en pigments liposolubles (mg/g d'extrait sec) des different extraits de <i>Globularia alypum</i>	24
Tableau 4 : Teneur en pigments liposolubles (mg/g d'extrait sec) des different extraits de <i>Retama sphaerocarpa</i>	24
Tableau 5 : Activité antibactérienne des extraits de <i>Globularia alypum</i> exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm.	28
Tableau 6 : Activité antibactérienne des extraits de <i>Retama sphaerocarpa</i> exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm.	29
Tableu 7 : Concentration minimale inhibitrice(CMI) et bactéricide/fongicide(CMB et CMF) de <i>Globularia alypum</i>	29
Tableau 8 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide/fongicide(CMB et CMF) de <i>Retama sphaerocarpa</i>	29

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, l'homme a toujours apprécié les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. En effet, à travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicinales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent être plus fondées et plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif d'atténuer la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (**Asraoui et al., 2021**).

En Afrique plus de 81% de la population utilisent encore la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins de soins et de santé, et sur 252 médicaments utilisés, plus de 11% sont exclusivement produits à partir de plantes médicinales selon les estimations de l'Organisation mondiale de la santé (**OMS, 2015**). Les effets indésirables des médicaments de synthèses ainsi que leurs coûts élevés, l'éloignement et/ou l'insuffisance des centres de santé surtout en milieu rural qui limite une véritable prise en charge des problèmes de santé publique, tous ont favorisé le recours à l'usage de la médecine traditionnelle (**Riaz et al., 2020**). L'Algérie ne fait pas exception et l'utilisation des plantes médicinales en médecine traditionnelle pour le traitement de différentes maladies s'est développée de manière spectaculaire (**OMS, 2002**).

Les plantes constituent une source inépuisable de substances bioactives, en particulier, les métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les saponines, les glucosides..., impliqués dans des fonctions écologiques pour améliorer la survie des plantes au cours des stress environnementaux. D'autre part ces mêmes plantes procurent des propriétés curatives appréciables chez l'homme (**Khelifi et al., 2011; Chogarni et al., 2011**). L'Algérie bénéficie d'une gamme très variée de climats favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. En effet, le territoire Algérien a une couverture végétale diversifiée répartie sur les côtes, les plaines, les montagnes, la steppe, le Sahara et autour des points d'eau (**Hamel et al., 2018**). Ces plantes représentent une source de composés bioactifs et sont utilisées dans différents domaines. Parmi ces plantes, se trouvent de nombreuses espèces dont la plupart appartient à la famille Plantaginacée et Fabacée (**Asraoui et al., 2021 ; Louaar et al., 2007**).

Ces derniers temps, le vieillissement et les maladies liées au vieillissement, le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète, les troubles inflammatoires et neurodégénératifs ont augmenté de manière exponentielle, principalement en raison de l'inflammation systémique, de la perte de l'équilibre redox cellulaire et du stress oxydatif chronique (**Liguori et al., 2018 ; Salehi et al., 2020**). Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les capacités de défense antioxydant de l'organisme. Autrement dit c'est un déséquilibre de la balance entre la formation des radicaux libres (caractère pro-oxydant) et la capacité du corps à les neutraliser, à réparer les dommages oxydatifs (système antioxydant) et à réguler leur production. Produits de façon continue et élevée, (**Bougatef et al., 2009**) les ERO sont à l'origine d'un stress oxydant avec modifications irréversibles de lipides, de protéines et d'acides nucléiques. Pour se protéger du stress oxydant, (**Gulcin et al., 2012**) le corps humain est doté de plusieurs systèmes de défense dont certains sont endogènes alors que d'autres sont obtenus à partir de molécules apportées par l'alimentation (exogènes). Le système endogène comprend essentiellement des enzymes telles que la glutathion peroxydase, la catalase, et le superoxyde dismutase, alors que le système exogène comprend les vitamines C, E et A, les minéraux ainsi que les flavonoïdes. Ces molécules sont reconnues pour leurs nombreuses activités biologiques attribuées à leur capacité à piéger les radicaux libres, chélate les ions métalliques ou inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux libres (**Fantaine, 2007**).

D'autre part, les antibiotiques ont longtemps été considérés comme des armes efficaces pouvant éradiquer toute maladie infectieuse d'origine bactérienne. Toutefois, l'utilisation abusive de ces composés dans le domaine médical a eu pour conséquence l'apparition progressive d'une multitude de résistances chez les microorganismes. Au cours des décennies, la résistance microbienne a évolué jusqu'au point où elle est présentement un grand problème dans le domaine de la santé publique. En effet, la résistance est une réponse adaptative par laquelle les microorganismes commencent à tolérer la concentration d'une drogue qui serait normalement inhibitrice (**Talaro-Park, 2008**). La résistance microbienne peut être intrinsèque ou acquise. Les microbes peuvent acquérir une nouvelle résistance lorsqu'il se produit une mutation spontanée dans leurs gènes ou lorsqu'il y a un transfert de nouveaux gènes provenant d'une autre espèce. L'information génétique portant la résistance qui est transférée d'une espèce à une autre se trouve sur les chromosomes ou les plasmides. La résistance peut aussi être présente chez les microorganismes même avant qu'ils soient exposés aux drogues. Les microbes peuvent naturellement contenir l'information génétique menant à la résistance (**Tenover, 2006**). Il n'y a que quelques agents antimicrobiens pouvant

être utilisés contre certains pathogènes et ce nombre continue à diminuer. Effectivement, ce sont les microorganismes multi résistants aux drogues qui sont difficiles à traiter. Par exemple, les pathogènes multi résistants communs, tels que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* démontrent une résistance contre la majorité des drogues (**Rahal J, 2006**). Ainsi, le problème de résistance et de multi résistance de certaines souches bactériennes à l'égard de certains médicaments conventionnels, les effets bénéfiques recherchés souvent contre balancés par de fréquents effets secondaires a incité les scientifiques vers d'autres alternatives thérapeutiques plus sûres et plus efficaces.

L'évaluation des propriétés anti-oxydante et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile pour la découverte et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. C'est dans cette optique que s'inscrit l'objectif de notre travail à savoir l'évaluation des propriétés antioxydants et antimicrobiennes de deux plantes locales ; *Globularia alypum* "Tasselgha" et *Retama Sphaerocarpa* "Retam". L'étude de l'activité antioxydant des feuilles de *Globularia alypum* est très importante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (**Khantouche et al., 2018**). Par ailleurs, une enquête auprès des populations a montré que les tiges de *Retama Sphaerocarpa* étaient traditionnellement utilisées pour soigner la rage aussi bien chez l'homme que chez les animaux et pour préparer un type de tabac à chiquer communément appelé "Chemma".

Les objectifs de la présente étude sont ;

- Une analyse physicochimique à savoir ; la détermination de taux d'humidité, cendres, fraction lipidique.
- Extraction des substances actives par différents solvants (méthanol, éthanol, acétone, acétate d'éthyle) à 70%.
- Dosage des polyphénols, flavonoïdes, tanins condensés, caroténoïdes et pigments chlorophylliens des différents extraits des deux plantes.
- Evaluation des propriétés antioxydants *in vitro* des différents extraits à travers différents tests complémentaires soit : l'activité antioxydant totale (TAC), l'activité scavenger à l'égard du radical libre DPPH, et le pouvoir réducteur (FRAP).
- Evaluation de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de quatre souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*) et une souche de levure *Candida albicans*.

CHAPITRE I
Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

I.1.1 Description botanique et systématique de *Globularia alypum*

La plante *Globularia alypum* appelée aussi la globulaire est une plante appartenant à la famille des Globulariacées qui comprennent deux genres dont *Globularia* et *Poskea* et d'environ trente espèces répandues en Europe et en Afrique du nord. Son nom *Globularia* fait référence à la forme globuleuse de l'inflorescence et le terme *alypum* vient du grec *alypon* qui signifie calmer la douleur. *Globularia alypum* appelée communément Tasselgha; « Chebra », « Chelr'a », « Zerga », « zeriga », « zoutna », « alk », « haselra », « oulbarda ». Au Maroc elle est appelée Ein larneb. (Boussoualim, 2014). Le tableau 1 présente la classification botanique de la plante.

Tableau 1 : Classification botanique de *Globularia alypum*.

<i>Globularia alypum</i>	
Règne	Plantae
Classe	Dicotyledone
Ordre	Scrophlariales
Famille	Globulariaceae
Genre	<i>Globularia</i>
Espèce	<i>Globularia alypum</i> L

Les plantes du genre *Globularia* sont vivaces arbustes rameux d'environ 60 cm de hauteur (30-60cm). Leurs feuilles sont persistantes, coriaces, ovales, lancéolées, élargies à l'extrémité et atténuées à la base ; elles sont dites spatulées. Les fleurs réunies en capitules denses à bractées ciliées, atteignant près de 2 cm de diamètre et disposées le long et au sommet des tiges, elles sont d'un bleu clair réunies en capitule globuleux solitaire et situé à l'extrémité des rameaux (Quezel et Santa, 1962) (Figure 1).



Figure 1 : Photographie originale de l'espèce de *Globularia alypum* L.

I.1.2 Description botanique et systématique de *Retama sphaerocarpa*

Retama sphaerocarpa connue en Algérie sous le nom de R'tem ; « Tillugwît » «Îllugwî», « Allugû », « Talggû ». C'est un arbuste vivace pouvant atteindre 5 m de hauteur avec une structure modulaire simple composée de plusieurs branches, sa structure ouverte laisse passer une quantité suffisante de lumière. Ses petites feuilles éphémères tombent en quelques semaines, les fleurs sont petites (5-6 mm) de couleur jaune et apparaissent d'avril à mai, tandis que les fruits sont d'une couverture dure et apparaissent en hiver (janvier-février) (Figure 2).

Les légumineuses arbustives du genre *Retama* du bassin méditerranéen sont endémiques et elles sont réparties dans les différents climats méditerranéens (d'humide à aride) et dans les écosystèmes côtiers, dunes, maquis et déserts, car les arbustes *Retama* tolèrent les conditions de sécheresse extrême. Les espèces de *Retama* présentent un intérêt écologique pour la stabilisation des dunes, la fixation des sols et la revégétalisation des écosystèmes semi-arides. Le tableau 2 reprend la classification botanique de *Retama sphaerocarpa*.

Tableau 2 : Classification botanique de *Retama sphaerocarpa*.

<i>Retama sphaerocarpa</i>	
Règne	Végétal
Classe	Dicotyledone
Ordre	Fabales
Famille	Fabacées
Genre	Retama
Espèce	Retama sphaerocarpa



Figure 2 : Photographie originale de l'espèce *Retama sphaerocarpa*.

I.2.Récolte

Les feuilles de *Globularia alypum L* et les tiges de *Retama sphaerocarpa* ont été récoltées le 07-03-2021 dans la région de Tefreg, daïra de Djaafra, wilaya de Bordj Bou Arreridj. Les coordonnées GPS sont : 36°19'25.5"N 4°42'44.5"E.

I.3.Séchage, broyage et tamisage

La quantité de feuilles fraîches de *Globularia alypum* après nettoyage était de 1500g alors que celle des tiges de *Retama sphaerocarpa* était 1700g. Les feuilles et les tiges des deux plantes récoltées ont été séchées à l'air libre et à température ambiante dans un endroit aéré et à l'ombre pendant 6 jours. Après séchage, les feuilles et les tiges ont été broyées séparément jusqu'à l'obtention de poudres fines à l'aide d'un broyeur électrique de type Moulinex 220-240 V. La quantité de poudre obtenue est de 410,5g pour *Retama sphaerocarpa* et 325g pour *Globularia alypum*. Les poudres obtenues ont été tamisées à l'aide d'un tamis de granulométrie de 200 μ m afin de récupérer des poudres très fines et d'optimiser l'extraction. Les poudres ont été conservées dans des flacons en verre fermé et stockés à l'abri de la lumière dans un réfrigérateur ($T^{\circ}= 4^{\circ}\text{C}$) (**Annexe 1**).

I.4. Etude physicochimique

I.4.1. Détermination du taux d'humidité

La détermination du taux d'humidité de la poudre sèche permet de vérifier sa bonne conservation ainsi que son bon conditionnement. Il faut, en outre, tenir compte de cette teneur en eau dans les dosages des principes actifs. D'après les normes décrites dans la pharmacopée européenne (2000), cette teneur ne doit pas dépasser les 12 %.

a) Teneur en eau

La teneur en eau des deux plantes a été déterminée comme suit : une quantité précise des feuilles de *Globularia alypum* et des tiges de *Retama sphaerocarpa* fraîches est pesée, après séchage à l'air libre à température ambiante et à l'ombre pendant environ 6 jours, ces mêmes feuilles et tiges ont été pesées une deuxième fois pour déterminer la diminution du poids.

$$H(\%) = [(poids \alpha - poids \beta) / poids \alpha] \times 100\%$$

Considérons ;

α → Poids (g) de l'échantillon "Feuilles fraîches".

β → Poids (g) de l'échantillon "Feuilles sèches".

H(%) → Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

b) Humidité de la poudre

L'humidité de la poudre a été déterminée par la méthode de séchage à l'étuve selon AOAC (2000). Une quantité de 2g de poudre de feuilles et de tiges est mise dans un creuset en porcelaine préalablement taré. Le creuset et son contenu sont ensuite placés dans une étuve (Memmert type-ONE 7, Schutzart DIN EN 60529-IP 20. Germany) à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24h. Après refroidissement dans un dessiccateur renfermant un desséchant (gel de silice), les creusets ont été pesés. L'expérience a été répétée 3 fois.

$$H(\%) = [(m - m')/m] \times 100\%$$

Où ;

H : Humidité.

m: masse de l'échantillon avant séchage.

m': masse de l'échantillon après séchage = masse (creuset + échantillon) – masse du creuset vide.

I.4.2 Détermination du taux de cendre

Les cendres totales représentent les résidus en composés minéraux qui restent après l'incinération d'un échantillon contenant des substances organiques d'origine animale, végétale ou synthétique. Les cendres représentent environ 1 à 5% de la masse d'un aliment sur une base humide. Le taux de cendre est déterminé selon **AOAC (2000)** après minéralisation par voie sèche, dans un creuset en porcelaine, préalablement taré, on introduit 2g de poudre végétale dans un four à moufle de type memmert à une température de 800°C pendant 10 heures jusqu'à l'obtention des cendres blanches (toute la matière organique brûle et on ne récupère que la partie inorganique de l'échantillon), on laisse refroidir dans un dessiccateur puis on note le poids des creusets.

$$\text{Calcule : } T_c (\%) = [(M-M') / E] \times 100\%$$

Où ;

T_c : taux de cendre.

M : masse finale (creuset + cendres totales).

M' : masse du creuset vide.

E : prise d'essai de la matière.

I.4.3. Teneur en matière lipidique

a- Méthode Soxhlet

La détermination de la teneur en matière grasse de l'échantillon (poudre de la plante) a été réalisée par extraction au soxhlet (**BIPEA, 1976**). C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse à la fin de l'extraction.

b- Principe de la méthode

L'échantillon solide est pesé (10g de poudre de chaque plante) et placé dans une cartouche d'extraction (cartouche de Wattman) qui ensuite insérée dans l'ampoule d'extraction. Un ballon à fond rond préalablement pesé (P_1) est rempli au 2/3 d'éther de pétrole. L'échantillon est extrait en continu par l'éther de pétrole à ébullition (P.E. 35°C) qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. Comme seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'éther est évaporé, généralement sur un évaporateur rotatif, et le ballon contenant la matière grasse est pesée pour obtenir le poids (P_2).

L'expression des résultats obtenus par le calcul du pourcentage de la matière grasse est la suivante :

$$\text{MG (\%)} = [(P_2 - P_1) \times 100] / \text{PE}$$

Avec :

MG= matière grasse

P_2 = poids du ballon + masse de la matière grasse (g) sec

P_1 = poids du ballon vide (g)

PE=prise d'essai = poids de l'échantillon (g)

I.5. Etude phytochimique**I.5.1. Préparation des extraits**

La préparation des extraits à partir des feuilles de *Globularia alypum* et des tiges de *Retama sphaerocarpa* a été réalisée par la méthode de macération. Des quantités de 10g de la matière végétale ont été extraites à l'aide de 150 ml de différents solvants (méthanol 70%, acétone 70%, éthanol 70%, acétate d'éthyle 70%) avec une agitation à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 24 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation. Après extraction, chaque mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre. Une deuxième extraction a été effectuée dans les mêmes conditions afin d'obtenir un maximum de substances actives. Les filtrats obtenus sont séchés sous vide à l'aide d'un rota vapeur.

Les extraits séchés ont été conservés dans des flacons à 4°C jusqu'à utilisation pour les dosages et les différents tests (**Annexe 2**).

I.5.2. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement d'une extraction est le rapport entre le poids de l'extrait sec et le poids de la plante en poudre utilisée. Il est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$R (\%) = (P_S / P_P) \times 100\%$$

Où ;

P_S : poids de l'extrait sec en gramme (g),

P_P : poids de la poudre en gramme (g)

I.5.3. Dosage des composés phénoliques totaux

Le contenu en phénols totaux des différents extraits est déterminé en utilisant le protocole décrit par **Singleton et Rossi (1965)**. Le réactif de Folin- Ciocalteu, mélange d'acides phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), est réduit en présence de polyphénols en un mélange bleu d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle aux taux des composés phénoliques présents dans la solution (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Brièvement, 1 ml du réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 μ l d'échantillon ou standard avec des dilutions convenables. Après 4 min, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (7,5%) sont additionnés au mélange réactionnel. Ce dernier est laissé pendant 2h à température ambiante et à l'abri de la lumière puis l'absorbance est mesurée à 760nm par rapport à un blanc sans extrait. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-300 μ g/ml) et est exprimée en μ g équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait sec) (**Annexe3**).

I.5.4. Teneur en flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de *Globularia alypum* et *Retama sphaerocarpa* est réalisée par la méthode décrite par **Jain et al, (2011)**. Cette méthode repose sur la capacité des flavonoïdes à chélater des métaux (chlorure d'aluminium) et de former un complexe de coloration jaunâtre. Les flavonoïdes contiennent des groupements hydroxyles (OH) libre, en position 3 et 5, ces groupements sont susceptibles de former des complexes avec le groupement CO, en présence de chlorure d'aluminium.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de complexes formés (**Ribéreau Gayon et al., 1972**).

Un volume de 1 ml de chaque extrait ou de solution étalon (quercétine) à différentes concentrations est réagi avec 1 ml de chlorure d'aluminium (2%). Dans le témoin l'extrait est remplacé par les solvants d'extraction. On laisse incuber pendant 1h à température ambiante. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

Les absorbances sont lues à 430 nm au spectrophotomètre UV-visible double faisceau (UV-1800 shimadzu). La teneur totale en flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent de quercétine (QE)/g d'extrait. (**Annexe 4**).

I.5.5. Dosage des tanins condensés (Pro-anthocyanidines)

La teneur en pro-anthocyanidines est mesurée suivant le protocole de **Sun et al, (1998)** tel que rapporté par **Oyedmi et Afolayan, (2011)** avec quelques modifications. Le principe de la méthode est basé sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré (**Ba et al., 2010**).

Un volume de 0,5 ml de la solution d'extrait (1 mg/ml) est mélangé avec 3 ml de la solution de vanilline (4%), préalablement préparée dans du méthanol, et 1,5 ml d'HCl (37%). Le mélange est bien agité, puis incubé pendant 15 min à température ambiante. L'absorbance est lue à 500 nm. Un témoin est préparé en mélangeant 0,5 ml d'extrait avec 3 ml de méthanol et 1,5 ml d'HCl. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata. Une courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant la catéchine comme standard et la concentration est exprimée en mg équivalent catéchine /g d'extrait sec (**Annexe 5**).

I.5.6. Dosage des caroténoïdes

Les doubles liaisons conjuguées contenues dans la structure de caroténoïdes sont responsables de l'absorption de la lumière générée par excitation des électrons des liaisons π (**Rodriguez-Amaya, 2001**). Le dosage des caroténoïdes est déterminé selon la méthode de **Sass-Kiss et al, (2005)**. Un poids déterminé de la poudre est additionné à 10ml d'un mélange de solvant (hexane, acétone, éthanol) (2:1:1, V/V/V).

Après agitation pendant 15 min, le mélange est centrifugé à 4500 tours/min pendant 15 min. La phase supérieure (hexanique) contenant les pigments, est récupérée et le culot est soumis à une deuxième extraction dans les mêmes conditions. Les deux phases hexadiques

sont mélangées puis l'absorbance du mélange est mesurée par spectrophotomètre UV-VIS à 450nm.

Les résultats sont exprimés en μg équivalent β -carotène par g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de la β -carotène ($\mu\text{g E } \beta\text{-C /g}$) (**Annexe 6**).

I.5.7. Dosage des pigments liposolubles

La détermination des teneurs en β -carotène, lycopène et chlorophylle des différents extraits est réalisée par spectrophotométrie selon le protocole décrit par **Nagata et Yamashita, (1992)**.

Brièvement, 100 mg de chaque extrait sont ajoutés à 10 ml d'un mélange acétone-hexane (4:6 V/V) puis agités vigoureusement pendant 1 min, ensuite le tout est filtré à travers un papier Whatman N°4. L'absorbance des filtrats est mesurée à différentes longueurs d'ondes 453 nm, 505 nm, 645 nm et 663 nm.

La teneur en pigments est calculée suivant les équations indiquées ci-dessous et les résultats sont exprimés en mg de chlorophylle, caroténoïdes ou β -carotène /g d'extrait sec.

Calcul ;

- β -carotène (mg/100 ml) = $0,216 \times A_{663} - 1,22 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$
- Lycopène (mg/100 ml) = $- 0,0458 \times A_{663} + 0,204 \times A_{645} - 0,372 \times A_{505} + 0,0806 \times A_{453}$
- Chlorophylle a (mg/100 ml) = $0,999 \times A_{663} - 0,0989 \times A_{645}$
- Chlorophylle b (mg/100 ml) = $- 0,328 \times A_{663} + 1,77 \times A_{645}$

I.6. Évaluation de l'activité antioxydante

I.6.1. Dosage de l'activité anti-radicalaire (test DPPH)

L'activité anti-radicalaire des différents extraits est déterminée en utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) comme radical libre relativement stable selon le protocole décrit par **Burits et Bucar, (2000)**. Le DPPH est dissout dans 100 ml de méthanol pour préparer une solution mère qui ensuite diluée pour obtenir une absorbance de $(0,98 \pm 0,02)$ à 517 nm. Un volume de 100 μ l de chaque extrait à différentes concentrations ou standards (BHA, acide ascorbique, quercétine) est ajouté à 2,5ml DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. Un blanc pour chaque extrait est préparé en mélangeant 1,25 ml de méthanol avec 50 μ l de solution d'extrait. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata. L'activité anti-radicalaire est calculée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = [(Abs_{517} \text{ contrôle} - Abs_{517} \text{ échantillon}) / Abs_{517} \text{ contrôle}] \times 100\%$$

I.6.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits des deux plantes est mesuré selon la méthode décrite par **Oyaizu, (1986)**. Cette méthode mesure le pouvoir réducteur des antioxydants présents dans un mélange par leur capacité à réduire le Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ (Ferricyanure de potassium) en Fe^{2+} qui réagit à son tour avec le Chlorure ferrique ($FeCl_3$) pour donner un complexe mesurable à 700 nm (**Jayanthi et Lalitha, 2011**). Un volume de 200 μ L de solution de chaque extraits à différentes concentrations est mélangé avec 500 μ L d'une solution tampon phosphate (0,2 M ; pH = 6,6) et 2,5 ml de la solution de Ferricyanate de potassium à 1% ($K_3Fe(CN)_6$), préparé dans l'eau distillée. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min, puis les tubes à essais sont retirés et refroidis et 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% (TCA) sont ajoutés au mélange suivi d'une centrifugation à 650 rpm pendant 10min. Un volume de 500 μ L de surnageant est prélevé auquel sont ajoutés 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de $FeCl_3$ à 0,1%. La mesure de l'absorbance est effectuée à 700 nm. Un blanc est préparé en remplaçant l'extrait par le solvant. L'acide ascorbique et BHT sont utilisés comme contrôle positif dans les mêmes conditions.

I.6.3. Capacité antioxydant totale

La capacité antioxydant totale des extraits a été évaluée par le test du phosphomolybdène selon la procédure décrite par **Prieto et al, (1999)**. Une aliquote de 0,3 ml de chaque extrait ou étalon a été mélangée avec 3 ml du mélange réactionnel (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Ensuite, les mélanges ont été incubés à 95°C pendant 90 min et l'absorbance a été enregistrée à 695 nm. L'activité antioxydante a été exprimée en µg équivalent d'acide ascorbique par mg d'extrait sec (µg EAA /mg de ES).

I.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa*, plusieurs souches bactériennes et une souche de levure ont été testées, selon le protocole décrit par **Yollande, (2009)**.

Les principales souches sont :

- Les bactéries à Gram-négatif : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Les bactéries à Gram-positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876.
- Souche de levure : *Candida albicans*.

a.Mode opératoire

Le milieu de culture utilisé pour l'évaluation de l'activité anti microbienne est la gélose Mueller Hinton. La technique des puits utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet antimicrobien est aussi appelée la technique de dilution en gélose pour la détermination des extraits actifs. Des boîtes de Pétri contenant de la gélose Mueller Hinton sontensemencées aseptiquement par une suspension qui provient d'une culture jeune de bactéries. L'ensemencement se fait par écouvillonnage, le frottement de l'écouvillon sur la même boîte de pétri a été répété à trois reprises en tournant à chaque fois la boîte d'un angle de 60°. Après le séchage des boîtes, cinq puits perforés dans la gélose sont réalisés à l'aide de la partie supérieure d'une pipette Pasteur.

Ces puits ont été ensuite remplis avec 80 µl de chaque extrait à différentes concentrations (128, 64, 32, 16 et 8 mg/ml). Des essais témoins sont effectués avec le DMF pure comme

contrôle négatifs vis-à-vis de chaque type de souche microbienne. La gentamicine, antibiotique de référence, est utilisée comme standard. Les boîtes sont ensuite mises en incubation dans une étuve à 37°C pendant 24h. L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibitions. Un produit est considéré actif lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm.

b.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration de la substance antibactérienne inhibant toute croissance visible après un temps d'incubation de 18h à 24h.

Le principe de la méthode consiste à diluer la substance antimicrobienne à tester et à inoculer le milieu avec les microorganismes.

L'extrait montrant la meilleure activité antimicrobienne, a subi des dilutions successives de concentration mère (SM =128mg/ml) (1/2, 1/4 ... etc.) afin de déterminer la moindre concentration donnant une zone d'inhibition. Cette concentration est considéré comme la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Min et al., 2008).

c.Détermination de la concentration minimale bactéricide/fongicide (CMB et CMF)

La CMB est la concentration de la substance antibactérienne exerçant un effet bactéricide et permettant d'obtenir, après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, 0,1% de germes, c'est-à-dire une bactérie pour 1000 de l'inoculum initial (Rodriguez-Vaquero et al., 2007).

Pour la détermination de la CMB, la surface de chaque zone d'inhibition (Solution mère, 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16) est raclée à l'aide d'une pipette Pasteur. Ensuite des tubes de bouillon nutritif sontensemencés par les morceaux de gélose raclés. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24^h. L'absence de croissance dans les tubes inoculés, indiquant un effet bactéricide et le tube montrant aucune croissance (pas de trouble) et est ayant une CMB (Salama et Marraiki, 2010).

I.8. Analyse statistique

Toutes les expérimentations du présent travail sont répétées au moins trois fois. Les graphes sont mis en forme par EXCEL. L'étude statistique est réalisée à l'aide d'un logiciel statistique (Stat View v 5.0) et les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. Des comparaisons statistiques ont été effectuées avec le test Student t ou les tests ANOVA. Les différences ont été considérées significatives à $p < 0,05$ ou à $p < 0,01$.

CHAPITRE II

Résultats et discussion

II.1. Résultats de l'étude physicochimique

II.1.1. Taux d'humidité des feuilles fraîches

Les teneurs en eau des deux plantes étudiées à savoir *Globularia alypum* et *Retama sphaerocarpa* sont données dans la figure 3, elles sont exprimées en pourcentage (%). Les analyses montrent que les feuilles fraîchement récoltées présentent une teneur importante en eau soit 51,61% pour *Globularia alypum* et 53,33% pour *Retama sphaerocarpa*. Cela signifie que l'eau occupe plus de 1/2 du poids des deux plantes.

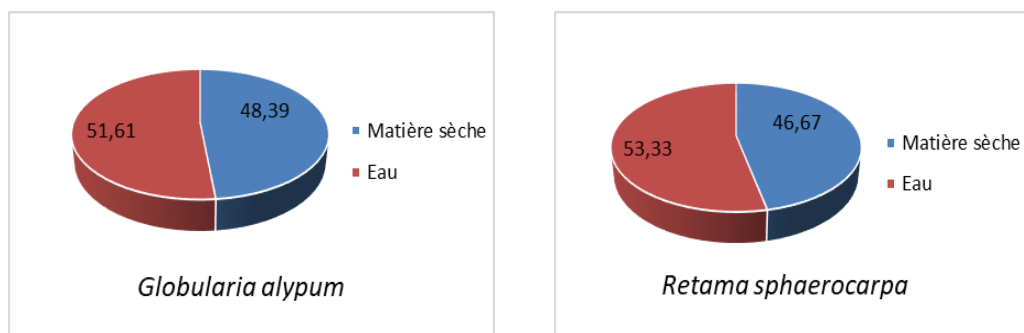


Figure 3 : Teneurs en eau de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa*.

II.1.2. Taux d'humidité de la poudre

Les résultats du taux d'humidité des poudres des deux plantes étudiées sont représentés dans la figure 4, elles sont exprimées également en pourcentage (%). Les valeurs moyennes de $8,20 \pm 0,075\%$ pour *Globularia alypum* et de $4,46 \pm 0,09\%$ pour *Retama sphaerocarpa*.

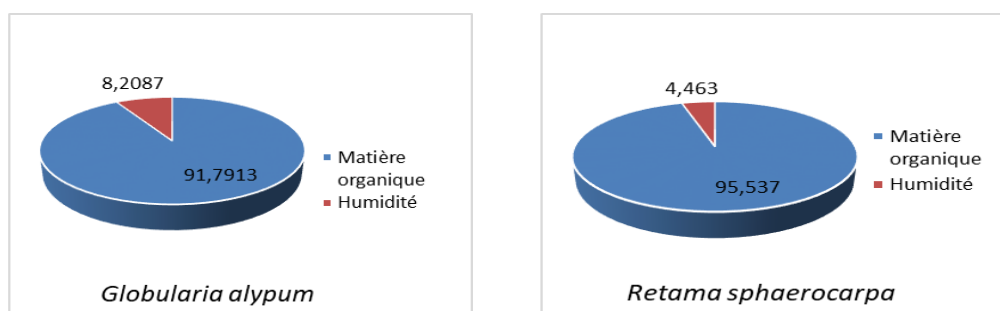


Figure 4 : Taux d'humidité des poudres de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa*.

II.1.3. Taux de cendre

Les résultats du taux de cendre des poudres de *Globularia alypum* et *Retama sphaerocarpa* sont représentés dans la figure 5, elles sont exprimées en pourcentage (%). Les valeurs moyennes sont de $3,37 \pm 0,065\%$ pour *Globularia alypum* et $2,89 \pm 0,155\%$ pour *Retama sphaerocarpa*.

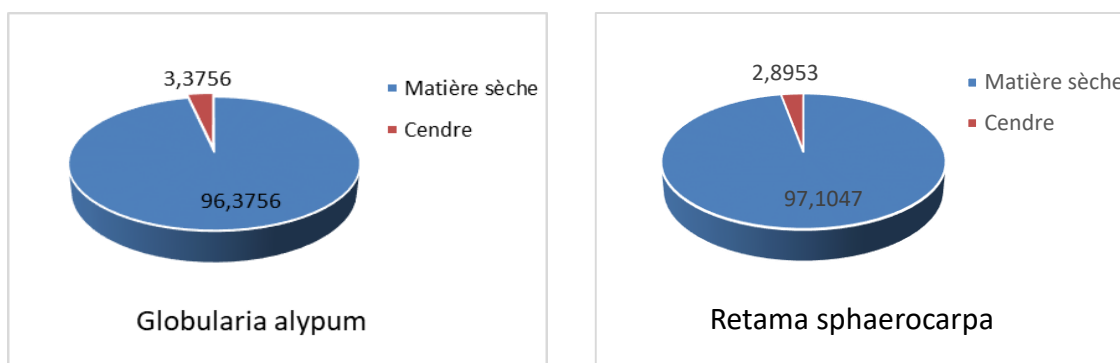


Figure 5 : Taux de cendre de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa*.

II.1.4. Teneur en matière grasse

Les résultats du dosage de la fraction lipidique des deux plantes *Globularia alypum* et *Retama sphaerocarpa* sont données dans la figure 6, elles sont exprimées en pourcentage (%). Dans la présente étude, les résultats du dosage de la fraction lipidique ont montré une teneur moyenne de $4,1404\% \pm 0,025\%$ pour *Globularia alypum* et de $2,1143\% \pm 0,025\%$ pour *Retama sphaerocarpa*.

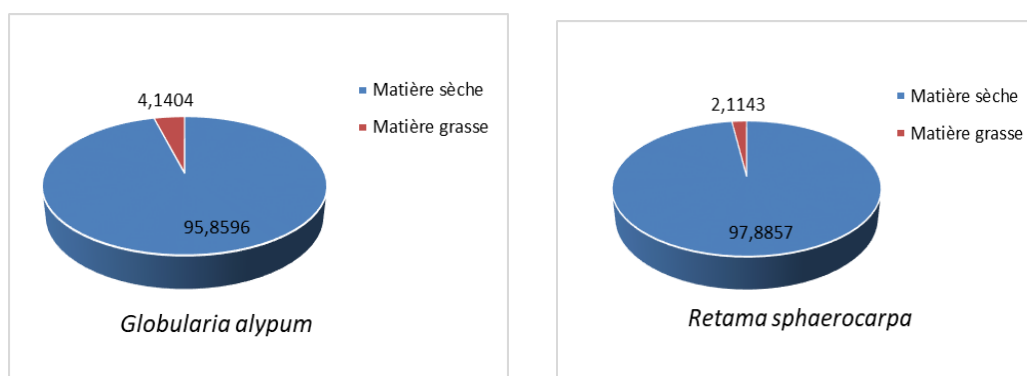


Figure 6 : Teneur en matière grasse de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa*.

Les résultats des taux d'humidité, de cendre, et de matière grasse obtenus dans la présente étude sont de $8,20 \pm 0,075\%$, $3,37 \pm 0,065\%$, $4,41404 \pm 0,025\%$, respectivement, ces résultats sont proches de ceux obtenus par **Khantouche et al, (2018)** qui ont analysé les taux d'humidité, de cendre et de matière grasse de la poudre des feuilles de *Globularia alypum* d'origine de Tunisie et qui ont trouvé des valeurs moyennes de $9,46 \pm 0,001\%$, $5,5 \pm 0,001\%$, et $3,05 \pm 0,03\%$, respectivement. Ceci est probablement lié aux mêmes conditions climatiques de cette plante.

II.2. Résultats de l'étude phytochimique

II.2.1. Rendements d'extraction

Quatre solvants ont été utilisés pour l'extraction des composés bioactifs à partir des feuilles de *Globularia alypum* et des tiges de *Retama sphaerocarpa*. La figure 7 illustre les résultats des rendements d'extraction des deux plantes. Concernant *Globularia alypum*, le taux le plus élevé a été détecté dans l'extrait méthanolique ($46,29 \pm 1,7\%$), suivi de l'extrait acétonique ($45,19 \pm 1,2\%$), puis l'extrait éthanolique ($44,53 \pm 0,17\%$), et en fin l'acétate d'éthyle qui a montré le rendement le plus bas ($22,31 \pm 0,11\%$). En revanche, pour ce qui est de *Retama sphaerocarpa*, le rendement le plus élevé a été détecté dans l'extrait d'acétate d'éthyle ($42,40 \pm 1,7\%$), suivi de l'extrait méthanolique ($40,76 \pm 1,2\%$), puis l'extrait acétonique ($35,27 \pm 0,17\%$), et en fin l'extrait éthanolique qui a montré le rendement le plus bas ($34,99 \pm 0,11\%$).

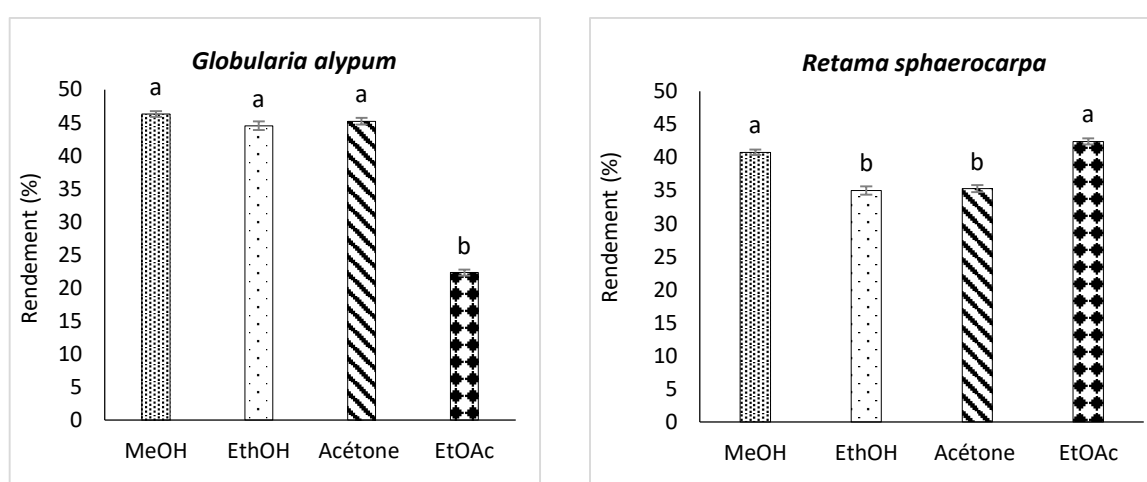


Figure 7 : Histogrammes montrant le rendement d'extraction de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa*.

Le rendement obtenu dans le présent travail (46,29%) est supérieur à ceux obtenus dans des travaux antérieurs réalisés sur la même espèce *Globularia alypum* qui ont rapporté des rendements en extrait méthanolique de 42% (Daycem et al., 2011) et de 35,52% (Boussoualim, 2014).

Le rendement d'extraction en substances phytochimiques dépend de plusieurs facteurs à savoir le temps de macération, la température, le solvant d'extraction et la nature chimique de l'échantillon (Su et al., 2006).

Dans le but de caractériser les différents extraits, différents dosages ont été effectués (polyphénols, flavonoïdes, tanins condensés, caroténoïdes, et pigments liposolubles).

II.2.2. Teneurs en polyphénols totaux

Les résultats du dosage des composés phénoliques montrent que les teneurs en polyphénols varient entre $71,43 \pm 0,18 \mu\text{g EAG/mg ES}$ et $335,55 \pm 0,48 \mu\text{g EAG/mg ES}$. La teneur la plus élevée a été détectée dans l'extrait acétonique pour *Retama sphaerocarpa* ($335,55 \pm 0,48 \mu\text{g EAG/mg ES}$) suivi de l'éthanolique $249,79 \pm 1,44 \mu\text{g EAG/mg ES}$, l'extrait méthanolique ($202,26 \pm 2,55 \mu\text{g EAG/mg ES}$), l'extrait d'acétate d'éthyle ($73,75 \pm 2,11 \mu\text{g EAG/mg ES}$). Dans le cas de *Globularia alypum*, la teneur la plus élevée a été détectée dans l'extrait éthanolique ($197,51 \pm 3,21 \mu\text{g EAG/mg ES}$) suivi de l'extrait méthanolique ($185,71 \pm 3,13 \mu\text{g EAG/mg ES}$), l'extrait acétonique ($165,49 \pm 3,9 \mu\text{g EAG/mg ES}$), et l'extrait d'acétate d'éthyle ($146,8 \pm 1,36 \mu\text{g EAG/mg ES}$).

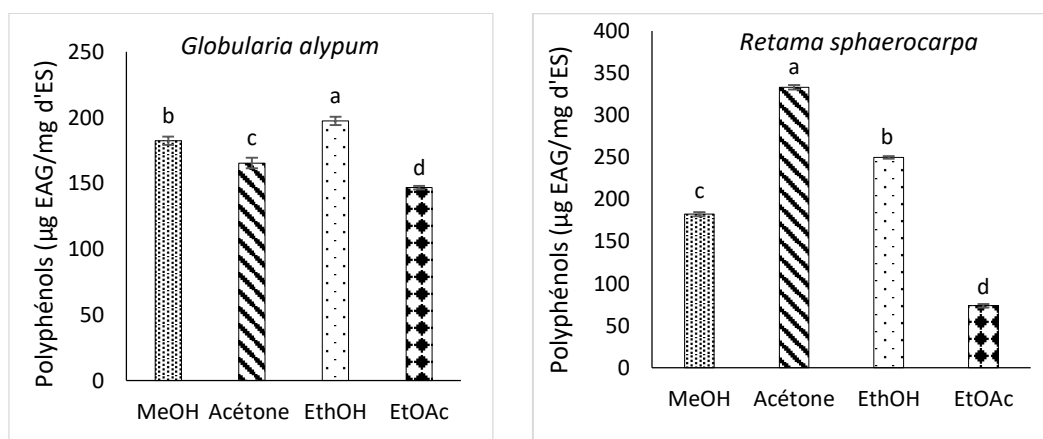


Figure 8 : Histogrammes montrant les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa*.

Dans la présente étude, l'extrait acétonique de *Retama sphaerocarpa* a montré la plus forte teneur en polyphénols alors que l'extrait méthanolique a montré une teneur moyenne de $202,26 \pm 2,55$ μg EAG/mg ES qui est légèrement inférieure à celle obtenue par **Boussahel et al., (2016)** ($241,875 \pm 16,369$ μg EAG/mg ES).

Dans le cas de *Globularia alypum*, la plus forte teneur en polyphénols a été détectée dans l'extrait méthanolique ($185,71 \pm 3,13$ μg EAG/mg ES) qui est largement supérieure à celle obtenue par **Boussoualim, (2014)** ($140,24 \pm 4,18$). Alors que l'extrait d'acétate d'éthyle a montré une teneur de $146,8 \pm 1,36$ μg EAG/mg ES qui est légèrement inférieure à celle obtenue par **Boussoualim, (2014)** ($157,74 \pm 5,27$ μg EAG/mg ES).

En comparant avec les travaux de **Djeridane et al, (2006)** qui ont travaillé sur les feuilles de *Globularia alypum* et qui ont utilisé le méthanol comme solvant d'extraction, ils trouvèrent une teneur en phénols totaux largement inférieure ($21,54 \pm 0,81$ mg Eq AG/g MS) à celle obtenue dans le présent travail.

II.2.3 Teneurs en flavonoïdes totaux

D'après les résultats obtenus, il apparaît là aussi que les teneurs en flavonoïdes totaux varient en fonction du solvant utilisé. L'extrait acétonique de *Globularia alypum* présente la plus grande concentration en flavonoïdes avec une valeur moyenne de $38,7 \pm 0,73$ mg EQ/g ES, suivi de l'extrait éthanolique avec une concentration moyenne de $35,21 \pm 1,25$ mg EQ/g ES, puis l'extrait méthanolique ($26,03 \pm 0,73$ mg EQ/g ES), et l'extrait acétate d'éthyle ($17,36 \pm 0,74$ mg EQ/g ES).

L'extrait d'acétate d'éthyle de *Retama sphaerocarpa* présente la plus grande concentration en flavonoïdes avec une valeur moyenne de $30,4 \pm 0,72$ mg EQ/g ES, suivi de l'extrait acétonique avec une concentration moyenne de $21,64 \pm 0,47$ mg EQ/g ES, puis l'extrait éthanolique ($11,83 \pm 0,88$ mg EQ/g ES), et l'extrait méthanolique ($9,84 \pm 0,09$ mg EQ/g ES).

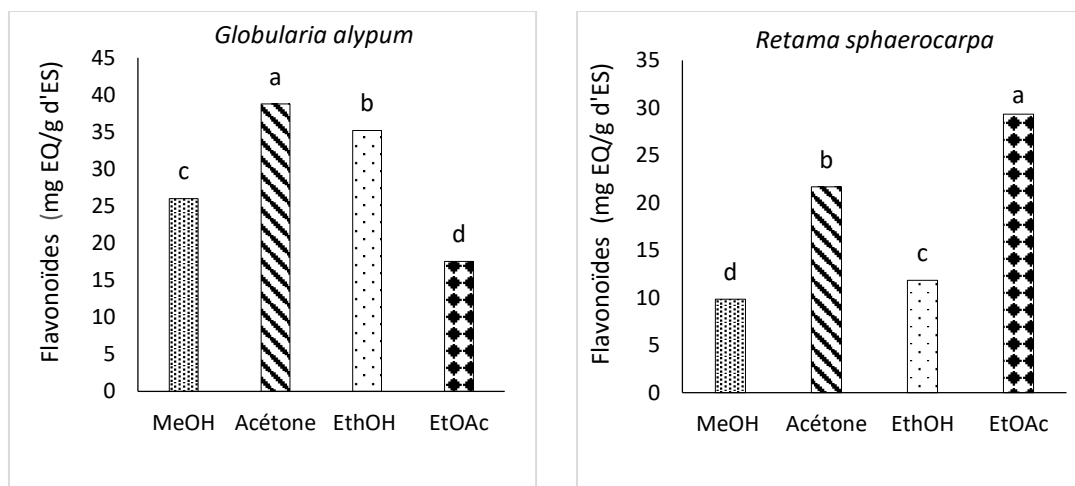


Figure 9 : Histogrammes montrant les teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa*.

Le dosage des flavonoïdes de *Globularia alypum* révèle une valeur supérieure à celle obtenue par **Daycem et al, (2011)** ($19,29 \pm 0,04$ mg EQ/g extrait) et **Khelifi et al, (2011)** ($18,20 \pm 0,25$ mg EQ/kg MS) et inférieure à celle obtenue par **Zeghada, (2009)** ($66,828 \pm 6,568$ mg EQ/g extrait). L'extrait d'acétate d'éthyle révèle une valeur de 17,36 une qui est supérieure à celle obtenue par **Boussoualim, (2014)** ($8,56 \pm 0,22$ µg EQ /mg d'extrait).

L'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa* a montré une faible concentration en flavonoïdes ($9,84 \pm 0,09$ mg EQ/g ES), cette valeur est inférieure à celle rapportée par **Boussahel, (2016)** ($37,243 \pm 2,930$ µg CE /mg extrait).

II.2.4. Teneurs en tanins condensés

Les résultats du dosage des tanins condensés montrent que les meilleures concentrations sont obtenues avec les extraits acétonique ($25,18 \pm 1,09$ mg EQ/g d'ES), éthanolique ($25,45 \pm 0,49$ mg EQ/g d'ES), et l'extrait acétate d'éthyle ($25,55 \pm 0,26$ mg EQ/g d'ES) de *Globularia alypum*. De même pour *Retama sphaerocarpa*, les concentrations les plus élevées ont été obtenues avec l'extrait acétonique ($23,66 \pm 0,51$ mg EQ/g d'ES), éthanolique ($23,73 \pm 0,5$ mg EQ/g d'ES), et l'extrait acétate d'éthyle ($19,95 \pm 0,3$ mg EQ/g d'ES).

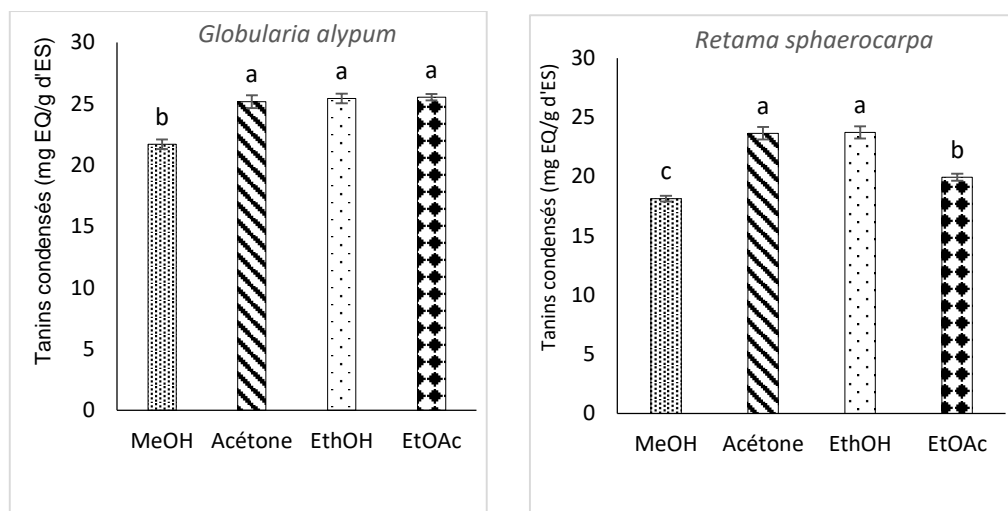


Figure 10: Histogrammes montrant les teneurs en tanins condensés des différents extraits de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa*.

L'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa* présente une valeur de $18,14 \pm 0,26$ mg EQ/g d'ES qui est supérieure à celle rapportée par **Boussahel et al, (2016)** ($4,657 \pm 0,134$ ng CE/mg ES).

En comparant avec les travaux de **Khelifi et al, (2011)**, il a été trouvé que l'extrait méthanolique et l'extrait acétonique de *Globularia alypum* présentaient des valeurs de $1,40 \pm 0,06$ g EqC/Kg ES et de $2,79 \pm 0,07$ g EqC/Kg ES, respectivement. Ces résultats sont largement inférieurs à ceux obtenus dans la présente étude.

II.2.5. Teneurs en caroténoïdes

La teneur la plus élevée en caroténoïdes a été observée dans la plante *Retama sphaerocarpa* ($48,80 \pm 0,835$ μ g/g MS), comparée à la plante *Globularia alypum* ($20,34 \pm 1,455$ μ g/g MS).

II.2.6. Teneurs en pigments liposolubles

Le tableau 3 montre que tous les extraits de *Globularia alypum* présentent des concentrations élevées en chlorophylle a. D'autres pigments ont été également détectés en de faibles concentrations.

Tableau 3: Teneur en pigments liposolubles (mg/g d'extrait sec) des différents extraits de *Globularia alypum*.

Pigments Solvant	Chlorophylle a (mg/g d'extrait sec)	Chlorophylle b (mg/g d'extrait sec)	Lycopène (mg/g d'extrait sec)	β- carotène (mg/g d'extrait sec)
Ethanol	110,53	13,75	6,55	27,39
Methanol	37,54	9,04	3,3	6,51
Acétate d'éthyle	304,22	50,58	21,51	34,136
Acétone	109,266	25,98	13,08	27,98

Le tableau 4 montre la teneur en pigments pour les différents extraits de *Retama sphaerocarpa*. On peut voir que tous les extraits présentent les concentrations les plus élevées en chlorophylle a et b, lycopène et β-carotène à l'exception de l'extrait méthanolique et de l'acétate d'éthyle qui ont montré des quantités insignifiantes en β-carotène.

Tableau 4: Teneur en pigments liposolubles (mg/g d'extrait sec) des différents extraits de *Retama sphaerocarpa*.

Pigments Solvant	Chlorophylle a (mg/g d'extrait sec)	Chlorophylle b (mg/g d'extrait sec)	Lycopène (mg/g d'extrait sec)	β- carotène (mg/g d'extrait sec)
Ethanol	310,64	65,5	26,09	27,31
Methanol	145,18	30,69	12,95	/
Acétate d'éthyle	139,03	97,53	36	/
Acétone	185,08	24,75	11,12	34,66

II.3. Activité antioxydante

II.3.1 Activité scavenger à l'égard du radical libre DPPH

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire d'un extrait de plante peut se faire par différents tests *in vitro*. L'une des méthodes les plus utilisées est l'activité scavenger à l'égard du radical libre DPPH. Les résultats obtenus révèlent que pour *Retama sphaerocarpa*, l'extrait éthanolique, l'extrait méthanolique, et l'extrait acétonique semblent être les plus actifs avec des IC₅₀ de 0,26 mg/ml, 0,27 mg/ml, et 0,28 mg/ml, respectivement. La capacité antioxydante des extraits étudiés est classée dans l'ordre suivant : éthanol > méthanol > acétone > acétate d'éthyle.

Dans le cas de *Globularia alypum*, la capacité antioxydante des extraits étudiés est classée dans l'ordre suivant : méthanol > éthanol > acétone > éthyle acétate. L'extrait méthanolique et l'extrait éthanolique étaient les plus actifs avec des IC₅₀ de 0,45 mg/ml et 0,5 mg/ml, respectivement.

Dans ce test, plusieurs antioxydants standards ont été utilisés à des fins comparatives. La quercétine et l'acide ascorbique ont montré la plus forte activité antiradicalaire avec des IC₅₀ de 0,142 mg/ml et 0,103 mg/ml, respectivement.

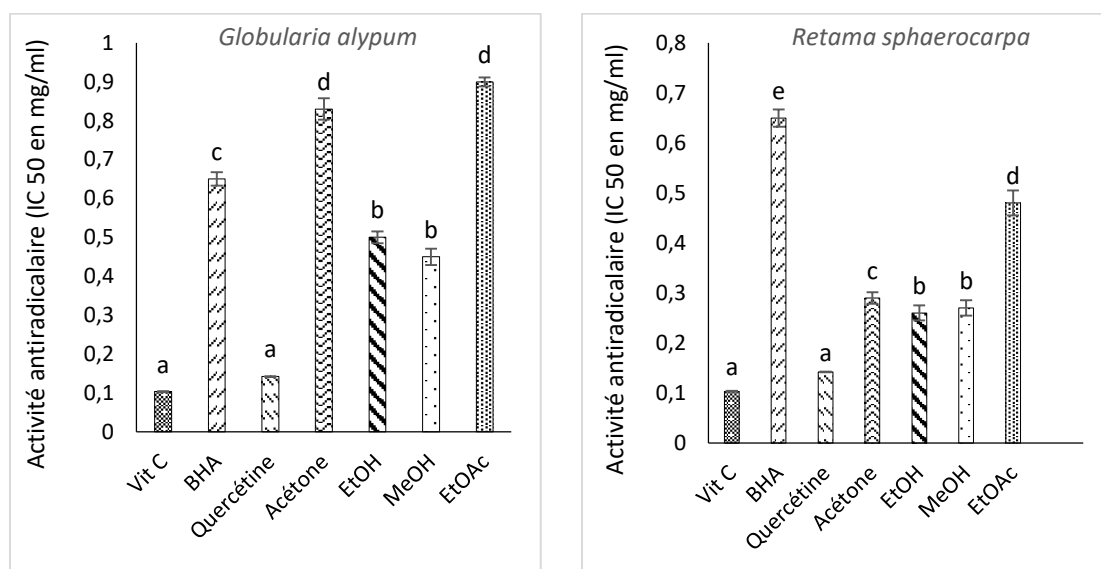


Figure 11 : Histogrammes montrant l'activité scavenger des différents extraits de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa* à l'égard du radical DPPH.

L'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa* montre une $IC_{50} = 0,27\text{mg/ml}$, ce résultat est supérieur à celui rapporté par **Edziri et al., (2008)** ($IC_{50} = 0.5\text{mg/ml}$). Pour ce qui est de *Globularia alypum*, l'extrait méthanolique est également le plus actif avec une IC_{50} égale à 0.45mg/ml qui est supérieure à celle obtenue par **Khelifi, (2011)** ($IC_{50} = 15,58\text{ mg/L}$).

II.3.2 Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est la capacité d'une substance à transférer un électron ou à libérer un atome d'hydrogène (**Sousa et al., 2008**). Il est très utilisé pour mesurer l'activité antioxydante des plantes médicinales. Les résultats obtenus montrent que les extraits étudiés présentent un pouvoir réducteur avéré. Le pouvoir réducteur des extraits de *Globularia alypum* sont classés dans l'ordre suivant : acétone ($EC_{50} = 3,95\text{mg/ml}$) > éthanol ($EC_{50} = 4,42\text{mg/ml}$) > acétate d'éthyle ($EC_{50} = 4,65\text{mg/ml}$) > méthanol ($EC_{50} = 5,57\text{mg/ml}$). Dans le cas de *Retama sphaerocarpa*, le pouvoir réducteur est classé comme suit : éthanol ($EC_{50} = 2,67\text{mg/ml}$) > acétone ($EC_{50} = 3,56\text{ mg/ml}$) > méthanol ($EC_{50} = 4,93\text{mg/ml}$) > acétate d'éthyle ($EC_{50} = 5,28\text{mg/ml}$).

Dans ce test, le BHT et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards à des fins comparatives et ont montré une puissante activité réductrice ($1,09\text{ mg/ml}$ et $0,28\text{ mg/ml}$, respectivement).

Cette différence en activité des différents extraits peut être expliquée par les différences de polarités des composés bioactifs de chaque extrait qui peut influencer leurs solubilités et leurs pouvoirs réducteurs (**Jayaprakasha et Patioli, 2007**).

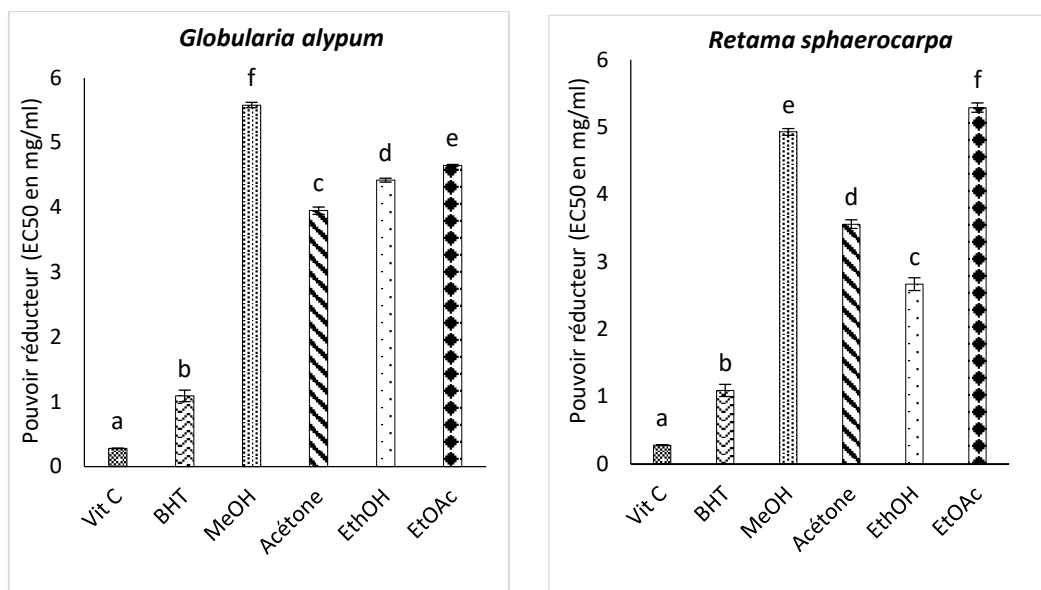


Figure 12 : Histogrammes montrant le pouvoir réducteur des différents extraits de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa*.

II.3.3. Capacité antioxydante totale

L'indice TAC (de l'anglais *Total Antioxidant Capacity* - capacité antioxydante totale) indique l'activité antioxydante globale d'un aliment ou d'une plante, c'est-à-dire sa capacité à neutraliser les radicaux libres dans l'organisme humain. Plus l'aliment a une valeur TAC élevée, plus il est antioxydant.

Les résultats montrent que les extraits de *Globularia alypum* ont une capacité antioxydante totale supérieure à celle des extraits de *Retama sphaerocarpa*. La CAT des extraits de *Globularia alypum* est classée dans l'ordre croissant suivant : Acétone (123,55 $\mu\text{gEAA/mg}$) < méthanol (179,39 $\mu\text{gEAA/mg}$) < acétate d'éthyl (254,99 $\mu\text{gEAA/mg}$) < éthanol (356,49 $\mu\text{gEAA/mg}$). Alors que pour les extraits de *Retama sphaerocarpa* la CAT est classée comme suit: acétate d'éthyl (41,92 $\mu\text{gEAA/mg}$) < acétone (83,07 $\mu\text{gEAA/mg}$) < méthanol (143,14 $\mu\text{gEAA/mg}$) < éthanol (171,78 $\mu\text{gEAA/mg}$).

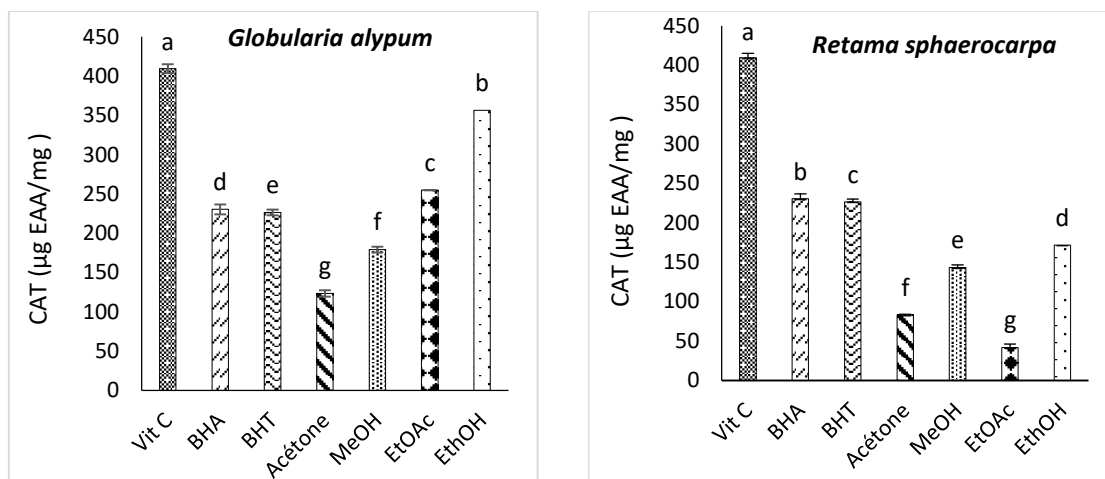


Figure 13 : Histogrammes montrant la capacité antioxydante totale des différents extraits de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa*.

La capacité antioxydante totale de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Retama sphaerocarpa* était de 41,92 µgEAA/mg. Cette valeur est inférieure à celle obtenue par **Belmokhtar, (2014)** (68.22± 0.48 mg/g EAA). En revanche, l'extrait méthanolique a montré une faible capacité antioxydante (143,14 µg EAA/mg) comparée à celle rapportée par **Belmokhtar, (2014)** (43.14± 0.31 mg/ g EAA).

II.4. Activité antimicrobienne

L'effet antimicrobien des extraits de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa* est évalué dans cette étude par la technique de diffusion sur l'agar. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 5 et 6.

Tableau 5 : Activité antimicrobienne des extraits de *Globularia alypum* exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm.

Solvant	MeOH	EtOH	Acétone	EtOAc	GEN
<i>P. aeruginosa</i>	23,63 ± 0,06	Pas d'activité	25,68 ± 0,07	24,90 ± 0,03	42,76 ± 0,64
<i>S. aureus</i>	21,09 ± 0,1	22,08 ± 0,06	20,86 ± 0,02	22,27 ± 0,03	19,00 ± 1,00
<i>E. coli</i>	15,11 ± 0,1	10,1 ± 0,02	8,58 ± 0,05	Pas d'activité	12,16 ± 0,70
<i>B. cereus</i>	12,83 ± 0,05	13,06 ± 0,05	12,05 ± 0,04	14,33 ± 0,14	30,26 ± 0,25
<i>C. albicans</i>	15,11 ± 0,11	15,1 ± 0,19	10,73 ± 0,43	19,70 ± 0,34	38,63 ± 0,12

Tableau 6 : Activité antimicrobienne des extraits de *Retama sphaerocarpa* exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm.

Solvant	MeOH	EtOH	Acétone	EtOAc
<i>P. aeruginosa</i>	24,6±0,2	23,24±0,11	24,47±0,12	29,13±0,04
<i>S. aureus</i>	20,18±0,1	20,25±0,06	19,5±0,02	20,7±0,03
<i>E. coli</i>	11,1±0,9	Pas d'activité	11,42±0,11	11,51±0,02
<i>B. cereus</i>	14,17±0,11	14,54±0,06	11,24±0,11	8,13±0,11
<i>C. albicans</i>	11,16±0,34	24,02±0,17	14±0,13	15,03±0,07

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides /fongicides (CMB et CMF) des extraits de *Globularia alypum* sont représentés dans les tableaux 7 et 8.

Tableau 7 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide/fongicide (CMB et CMF) de *Globularia alypum*.

	CMI				CMB et CMF			
	MeOH	EthOH	Acétone	EtOAC	MeOH	EthOH	Acétone	EtOAC
<i>P. aeruginosa</i>	8mg/ml	Pas d'activité	8mg/ml	8mg/ml	32mg/ml	Pas d'activité	64 mg/ml	32mg/ml
<i>B. cereus</i>	32mg/ml	8mg/ml	16mg/ml	8mg/ml	64 mg/ml	64 mg/ml	64 mg/ml	128mg/ml
<i>S. aureus</i>	8mg/ml	8mg/ml	8mg/ml	8mg/ml	64mg/ml	64mg/ml	128mg/ml	16mg/ml
<i>E. coli</i>	16mg/ml	16mg/ml	16mg/ml	Pas d'activité	64mg/ml	64mg/ml	64mg/ml	Pas d'activité
<i>C. albicans</i>	64mg/ml	16mg/ml	64mg/ml	16mg/ml	32mg/ml	64mg/ml	64mg/ml	64mg/ml

Tableau 8 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide/fongicide (CMB et CMF) de *Retama sphaerocarpa*.

	CMI				CMB et CMF			
	MeOH	EthOH	Acétone	EtOAC	MeOH	EthOH	Acétone	EtOAC
<i>P. aeruginosa</i>	8mg/ml	8mg/ml	8mg/ml	8mg/ml	32mg/ml	64mg/ml	64 mg/ml	16 mg/ml
<i>B. cereus</i>	8mg/ml	32mg/ml	16mg/ml	32mg/ml	32mg/ml	64mg/ml	64mg/ml	32 mg/ml
<i>S. aureus</i>	8mg/ml	8mg/ml	8mg/ml	8mg/ml	64mg/ml	32 mg/ml	32mg/ml	64 mg/ml
<i>E. coli</i>	64mg/ml	Pas d'activité	64mg/ml	16mg/ml	128mg/ml	Pas d'activité	128mg/ml	128mg/ml
<i>C. albicans</i>	64mg/ml	16mg/ml	32mg/ml	16mg/ml	128mg/ml	64mg/ml	64mg/ml	64mg/ml

L'évaluation de l'effet antimicrobien des extraits des deux plantes a montré que ces extraits ont une activité inhibitrice sur presque l'ensemble des souches étudiés, en particulier, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

Dans le cas des deux plantes, l'activité antimicrobienne exhibée par l'extrait d'acétate d'éthyle est plus importante que celle des autres extraits. Toutefois, l'extrait d'acétate d'éthyle de *Globularia alypum* reste inactif à l'égard *E. coli*.

Pour ce qui est de *Retama sphaerocarpa*, il a été constaté que l'extrait éthanolique est plus actif que l'extrait d'acétate d'éthyle sur *C.albicans* avec une zone d'inhibition de $24,02 \pm 0,17$ mm.

L'extrait d'acétate d'éthyle de *Globularia alypum* montre une activité antibactérienne plus importante que celle obtenue par **Boussoualim, (2014)** sur *P. aeruginosa*, *S. aureus*, et *B. cereus* avec des zones d'inhibition de 16, 20 mm, et 9 mm, respectivement. De même, nos résultats sont supérieurs à ceux rapporté par **Benaïssa et al, (2016)**.

Conclusion

Conclusion

Le présent travail a pour objectif l'étude physicochimique, phytochimique, l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne de différents extraits de plantes préparés à partir de différents solvants soit : le méthanol, l'éthanol, l'éthyle acétate, l'acétone, par macération des feuilles de *Globularia alypum* appartenant à la famille des Globulariacées et des tiges de *Retama sphaerocarpa* appartenant à la famille des Fabacées. L'ensemble des résultats obtenus nous a permis d'avoir une idée sur le profil physico-chimique, phytochimique et la capacité antioxydante et antimicrobienne des deux plantes. L'analyse quantitative des extraits étudiés révèle que ces plantes sont riches en polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes, tanins condensés et en pigments liposolubles.

D'autre part, l'étude du potentiel antioxydant effectué par plusieurs méthodes complémentaires (le piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur, et la capacité antioxydante totale) a montré que la plus part des extraits exhibent un pouvoir antioxydant important. Dans la présente étude, les extraits éthanolique et méthanolique des deux plantes présentent la plus grande activité antiradicalaire. En revanche, il a été constaté que l'extrait acétonique de *Globularia alypum* a exprimé le meilleur pouvoir réducteur et une plus forte capacité antioxydante totale.

L'activité antimicrobienne évaluée par les tests *in vitro* a montré que les extraits étudiés possèdent un pouvoir antimicrobien important sur les germes multirésistants responsables des maladies infectieuses. L'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce bactérienne, de la nature et de la concentration de l'extrait testé et aussi du milieu de culture.

Ces résultats préliminaires ouvrent des perspectives vers des études plus approfondies :

- Séparation et identification des composés actifs des deux plantes par des techniques d'analyse avancées (HPLC), et étude de leur toxicité.
- Elargir le spectre de l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo*.
- Orienter l'étude vers d'autres activités biologiques telles que l'activité antifongique, anti-inflammatoire, anticancéreuse, anti-hémolytique...etc.
 - Réaliser des études sur les autres parties de la plante. Envisager la formulation d'un médicament à base de la plante.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

Asraoui, Fadoua, Ayoub Kounoun, Hafssa El Cadi, Francesco Cacciola, Yassine Oulad El Majdoub, Filippo Alibrando, Filippo Mandolino, Paola Dugo, Luigi Mondello, et Adnane Louajri. (2021). « Phytochemical Investigation and Antioxidant Activity of *Globularia Alypum L.* » *Molecules* 26, no 3.

AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis* (13th edn). Association of Official Analytical Chemist: Washington, D C.

B

Ba K, Tine E, Destain J, Cisse N, Thonart P. (2010). Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol Agro Soc Environ*, Vol 14, pp 131-139.

BIPEA. (1976). *Recueil des Méthodes d'Analyse des Communautés Européennes*. BIPEA: Genevilliers; 51-52.

Belmokhtar Z. (2005). Identification et caractérisation des molécules du métabolisme secondaire de *Retama monosperma*. L Boiss, intérêt pharmaceutique, THÈSE, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf.

Benaissa akila ,Cherfia radia ,Canabady-Rochelle , Perrin. (2016). dominique,Chaimbault patrick Bouhelassa mohamed ,and Chaouche noureddine kacem . antioxidant and antimicrobial potentials of *retama sphaerocarpa*.

Boizot, N., Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, 79-82.

Bougatef Ali, Balti Rafik, Hajji Mohamed, Nasri Moncif. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases.

Boussahel S, (2016). Study of the Phytochemical Composition and Biological Activities of *Rhamnus Alaternus* and *Retama Sphaerocarpa* ,THESIS, Ferhat Abbas University, Setif 1.

Boussoualim N, (2014). Activités biologiques de plantes médicinales : *Anchusa azurea* Mill. et *Globularia alypum L.* Thèse, Université Ferhat Abbas Sétif 1.

Burits, M and F. Bucar, (2000). “Antioxidant Activity of Nigella Sativa Essential Oil,” *Phytotherapy Research*, Vol. 14, No. 5, pp. 323-328. Doi: 10.1002/1099-1573(200008)14:5<323::AID-PTR621>3.0.CO;2-Q.

C

Chograni H., Riahi L., Zaouli Y., and Boussaid M. (2012). Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum L.* (Globulariaceae). *Afr J Ecol.* 51(2) :343-347.

D

Daycem Khlifi ., Moktar Hamdi ., Akrem El Hayouni ., Sylvie Cazaux ., Jean Pierre Souchard ., François Couderc et Jalloul Bouajila.(2011). Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts of *Globularia alypum L.* (Globulariaceae) Leaves. *Molecules* Vol 16

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, 654–660.

E

Edziri, H., Mastouri, M., Ammar, S., Matieu, M., Patrich, G., Hiar, R., Mahjoub, M.A., Ali, S.M., Laurent, G., Zine, M., Aouni, M. (2008). Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of *Retama raetam* (Forssk.) Webb flowers growing in Tunisia. *World J Microbiol Biotechnol* 24, 2933–2940.

F

Fontaine, E. (2007). Radicaux libres. Dans : *Traité de nutrition artificielle de l’adulte.* Springer Verlag France. pp. 251-257.

G

Gülçin, I., Mahfus, E., Hassan, Y. A. E. (2012). Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of Chemistry.* 5(4) : 489-499.

H

Hamel T., Sadou S., Seridi R., Boukhdir S., and Boulemtafes A. (2018). Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'Edough (nord-est algerien). 59: 75.

J

Jayanthi, P., Lalitha, P. (2011). Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Int J of Pharm and Pharm Sci*, 3, 126-128.

Jayaprakasha, G.K., Patil, B.S. (2007). In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food. Chem* 101, 410–418.

Jain, D.P., Pancholi, S.S., Rakesh Patel, R. (2011). Synergistic antioxidant activity of green tea with some herbs. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2, 177–183.

K

Khantouche L., F. Guesmi, S. Motri and M. Abderabb. (2018). Nutritional Composition, Analysis of Secondary Metabolites and Antioxidative Effects of the Leaves of *Globularia alypum* L.

Khelifi D., Hamdi M., El Hayouni A., Cazaux S., Souchard J.P., Couderc F., and Bouajila J. (2011). Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) Leaves. *Molecules* 16: 10592-10603.

L

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging*, 13, 757-772.

Louaar, S., Akkal, S. Laouer, H., Guilet, D. (2007). Flavonoides of *Retama sphaerocarpa* leaves and their antimicrobial activities. *Chemistry of Natural Compounds* 43(5), 616-617.

M

Min, B.R., Pinchak, W.E., Merkel, R., Walker, S., Tomita, G & Anderson, R.C. (2008). Comparative antimicrobial activity of tannins extracts from perennial plants on mastitis pathogens. *Scientific Research and Essay*. 3(2): 66-73.

N

Nagata, M., Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *J. Japan. Soc Food Sci Technol*, 39 (10), 925-928.

O

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44, 307–315.

Oyedemi, S.O & Afolayan, A.j. (2011). In vitro and in vivo Antioxidant Activity of Aqueous Leaves Extract of *Leonotis (L.) R.Br.* *International Journal of Pharmacology*. 7(2): 248-256.

Organisation Mondiale de la santé (OMS). (2002). Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. WHO/EDM/TRM, Genève, p. 65.

P

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, 269, 337-341.

Q

Quezel et Santa. (1962). *Nouvelles Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, centre National de la recherche scientifique (Ed) 15, quasi Anatole-France-Paris 7^e.

R

Rahal, J. (2006). Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clinical infectious diseases*, 43(Supplement 2), S95-S99 actvt anti microb la multi résistance.

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, M., Ribéreau-Gayon, P. and Sudraud, P. (1972). *Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et controle des vins.* Ed. Dunod, Paris, p 671.

Riaz U., Alghtani A., Noman O., Algahtani A., Ibn moussa S., and Bourhia M. (2020). Areview on ethno-medicinal plants used in traditional medicine in the Kingdom of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

Rodriguez-Vaquero, M.J., Alberto, M.R & Manca, De., Nadra, M.C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 18: 93-101.

S

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic phosphotungstic acids reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.

Salama, H.M.H. & Marraiki, N. (2010). Antimicrobial activity et phytochemical analyses of *Polygonum aviculare* L. (polygonaceae), naturally growing in Egypt, *Saudi. Journal of biological sciences*. 17:57-63.

Salehi, B., Azzini, E., Zucca, P., Varoni, E.M., Kumar, N.V.A., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Fokou, P.V.T., Peluso, I.; et al. (2020). Plant-Derived Bioactives and Oxidative Stress-Related Disorders: A Key Trend towards Healthy Aging and Longevity Promotion. *Appl. Sci.* 10, 947. *Scientific Research and Essay*, 3(2), 66-73.

Sass-Kiss A., Kiss j., Milotay P., Kerek M.M., Toth-Markus M. (2005). Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruit and végétebales. *Food reseach international*, 20:1023-1029.

Su, X., Duan, J., Jian, Y., Shi, J and Kakuda ,Y. (2006). Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *J Food Composition Anal* 19: 348-353.

Sun, B., Richardo-da-Silvia, J.M., Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechin and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4267–4274.

Sousa, J.M., Souza, E.L., Marques, G., Meireles, B., Cordeiro, A.T.M., Gullónd, B., Pintado, M.M et Magnani, M. (2016). Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. *Journal of Food Science*; vol.84, p.61-68.

T

Talaro-Park, K. (2008). *Foundations in Microbiology*, Sixth Edition. New York, New York, McGraw-Hill Companies, Incorporated.

Tenover, F. R. (2006). “Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria”. *The American Journal of Medicine*, vol. 119, no 6, p. S3-S10.

Y

Yollande, K .N. (2009).Evaluation in vitro des pouvoirs antifongiques des extraits de feuille de papayer sur des souches de candidas albicans .ISTM Kinshasa- Gradué en technique de laboratoire. Romain. Vol (11). Pp, 33 -36.

Z

Zaghada, F. Z. (2008-2009). Activité analopatique et Analyse phytochimique .Université Oran E-Sania.

Annexe

Annexe 1 : préparation de la poudre des plantes *Globularia alypum* et *Retama sphaerocarpa*.



(1)

(2)

(3)

Images montrant les étapes de préparation de la poudre des plantes : (1) séchage, (2) broyage, (3) tamisage.

Annexe 2 : Préparation des extraits.



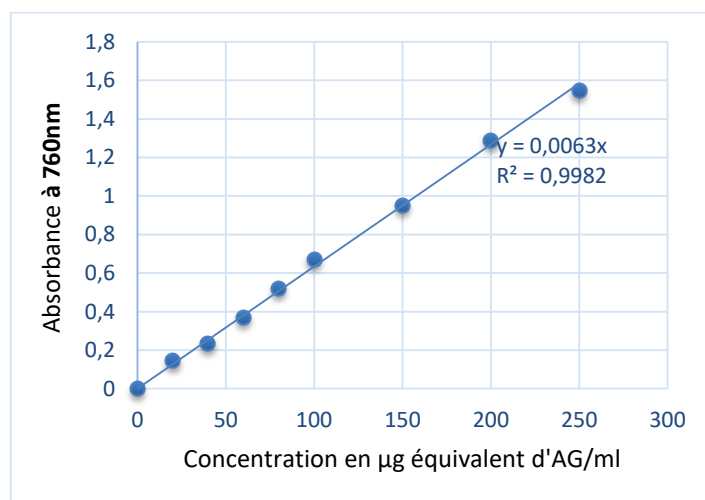
(1)



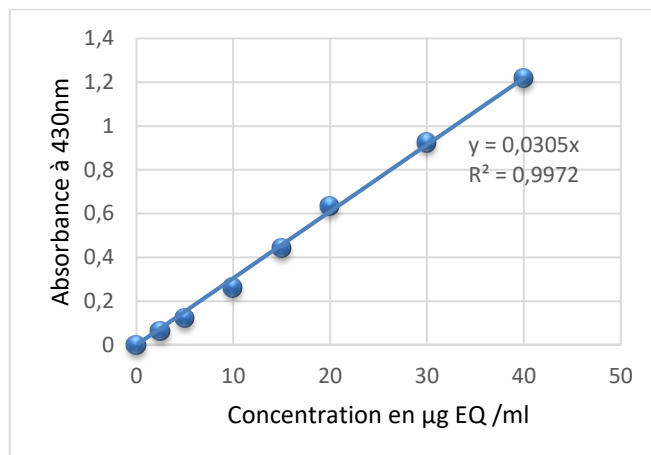
(2)

Etapes de préparation des extraits des plantes *Retama sphaerocarpa* et *Globularia alypum* par macération : (1) macération sous agitation, (2) filtration.

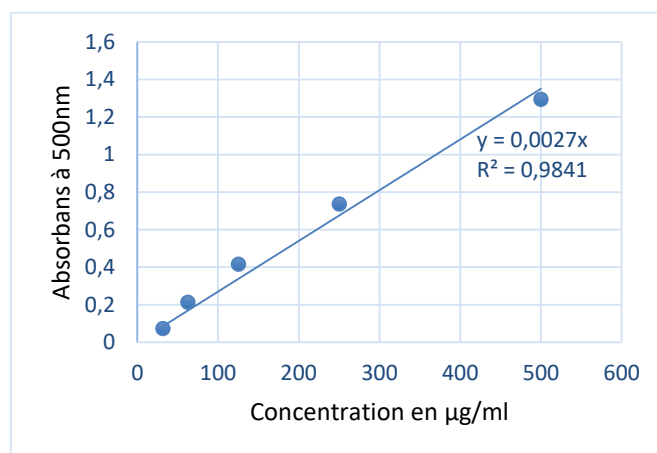
Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.



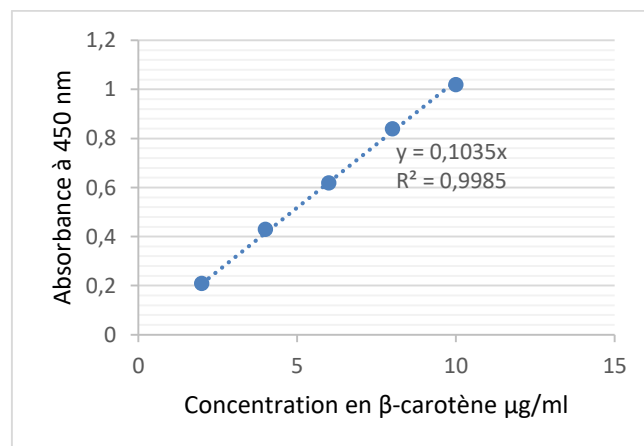
Annexe 4 : Droite d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.



Annexe 5 : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des tanins condensés.



Annexe 6 : Courbe d'étalonnage de la β -carotène pour le dosage des caroténoïdes



Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales locales, nous nous sommes intéressés à l'étude de la composition phytochimique et des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de différents extraits (méthanolique, éthanolique, acétonique et d'éthyle acétate) préparés à partir des feuilles de *Globularia alypum* et des tiges de *Retama sphaerocarpa*. Les résultats ont montré que l'extrait méthanolique de *Globularia alypum* présente le rendement le plus élevé ($46,29 \pm 1,7\%$) alors que pour *Retama sphaerocarpa* c'est l'extrait éthyle acétate qui présente le rendement le plus élevé ($42,40 \pm 1,7\%$). Les concentrations les plus élevées en polyphénols, flavonoïdes, tanins ont été obtenues avec les extraits acétoniques. La plus forte activité antiradicalaire au DPPH a été obtenue avec l'extrait méthanolique pour *Globularia alypum* ($IC_{50} = 0,45$ mg/ml) et l'extrait éthanolique pour *Retama sphaerocarpa* ($IC_{50} = 0,26$ mg/ml). De même pour les résultats du pouvoir réducteur, l' EC_{50} de l'extrait acétonique de *Globularia alypum* est de 3,95mg/ml, elle est de 2,67mg/ml l'extrait éthanolique pour *Retama sphaerocarpa*. Les meilleures CAT ont été obtenues avec l'extrait éthanolique pour les deux plantes (356,49 μ gEAA/mg pour *Globularia alypum* et 171,78 μ gEAA/mg pour *Retama sphaerocarpa*). L'effet antimicrobienne des extraits est évalué par la technique de diffusion vis-à-vis de 5 souches montre que les extraits éthyle acétate des deux plantes sont les plus efficaces sur les souches étudiées.

Mots clés : *Retama sphaerocarpa* ; *Globularia alypum* ; activité antioxydante ; activité antimicrobienne.

Abstract

As part of the valuation of local medicinal plants, we are interested in the study of the phytochemical composition and the antioxidant and antimicrobial properties of different extracts (methanol, ethanol, acetone and ethyl acetate) prepared from the leaves of *Globularia alypum* and the stems of *Retama sphaerocarpa*. The results showed that the methanolic extract of *Globularia alypum* exhibits the highest yield ($46.29 \pm 1.7\%$) while for *Retama sphaerocarpa* it is the ethyl acetate extract which exhibits the highest yield ($42.40 \pm 1.7\%$). The highest concentrations of polyphenols, flavonoids and tanins were obtained with the acetone extracts. The strongest anti-free radical activity with DPPH was obtained with the methanolic extract for *Globularia alypum* ($IC_{50} = 0.45$ mg/ml) and the ethanolic extract for *Retama sphaerocarpa* ($IC_{50} = 0.26$ mg/ml). Similarly for the results of reducing power, the EC_{50} of the acetonic extract of *Globularia alypum* is 3.95 mg/ml, it is 2.67 mg/ml of the ethanolic extract for *Retama sphaerocarpa*. The best CAT were obtained with the ethanolic extract for both plants (35.49 μ gEAA/mg for *Globularia alypum* and 171.78 μ gEAA / mg for *Retama sphaerocarpa*). The antimicrobial effect of the extracts is evaluated by the diffusion technique against five strains, showing that the ethyl acetate extracts from the two plants are the most effective on the strains studied.

Key words: *Retama sphaerocarpa*; *Globularia alypum*; antioxidant activity; antimicrobial activity.

المخلص

في إطار تقييم النباتات الطبية المحلية، نحن مهتمون بدراسة التركيب الكيميائي النباتي والخصائص المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات لمستخلصات مختلفة (الميثانول والإيثانول والأسيتون وأسيتات الإيثيل) المحضرة من أوراق *Globularia alypum* وسيقان *Retama sphaerocarpa*. أظهرت النتائج أن المستخلص الميثانولي من *Globularia alypum* قدم أعلى إنتاجية ($46.29 \pm 1.7\%$) بينما بالنسبة لـ *Retama sphaerocarpa* هو مستخلص أسيتات الإيثيل ($42, 40 \pm 1.7\%$). تم الحصول على أعلى تركيزات من البوليفينول والفلافونويد والعفص من مستخلصات الأسيتون. تم الحصول على أقوى نشاط مضاد للجذور الحرة باستخدام DPPH مع المستخلص الميثانولي لـ *Globularia alypum* ($IC_{50} = 0,45$ ملغ/مل) والمستخلص الأسيتون ($EC_{50} = 3,95$ ملغ/مل) باستخدام FRAP. والمستخلص الإيثانولي لـ *Retama sphaerocarpa* ($IC_{50} = 0,26$ ملغ/مل) باستخدام DPPH و ($EC_{50} = 2,67$ ملغ/مل) باستخدام FRAP. تم الحصول على أفضل CAT باستخدام المستخلص الإيثانولي لكلا النباتين (356,49 ميكروغرام / ملغ من أجل *Globularia alypum* و 171,78 ميكروغرام / ملغ من أجل *Retama sphaerocarpa*). تم تقييم التأثير المضاد للميكروبات للمستخلصات من خلال تقنية الانتشار على 5 سلالات، مما أظهر أن مستخلصات أسيتات الإيثيل من النباتين هي الأكثر فعالية على السلالات المدروسة.

الكلمات المفتاحية: *Retama sphaerocarpa* ؛ *Globularia alypum* ؛ النشاط المضاد للأكسدة ؛ نشاط مضادات الميكروبات.