



République Algérienne Démocratique et Populaire

*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique*



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR –KHENCHELA-

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

FILIERE : Biologie

OPTION : Biochimie appliquée

Thème

**Etude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de
l'extrait méthanolique d'une plante médicinale
« *Globularia alypum* »**

Présentée par :

MOUSSAOUI Manel

Jury de soutenance :

Président : Mr. BOUFENNARA Souhil (M.C.A) Univ. Abbés Laghrou -Khenchela-

Encadreur : M^{me}. KARAALI Wahiba (M.A.A) Univ. Abbés Laghrou -Khenchela-

Examineur : Mr. BOUSSAA Abdelhalim (M.A.A) Univ. Abbés Laghrou -Khenchela-

Promotion : 2017

Dédicaces

*Je prie Dieu tout puissant de m'accorder patience et courage
pour finir ce mémoire*

*Je tiens à dédier ce modeste travail à ceux qui m'ont
toujours venu en aide et sacrifié leur réussite dans ma vie*

**** A ceux qui ont sacrifié leur vie pour que je sois, ce
que je suis aujourd'hui, qui sont les plus chères au monde :
mes parents...*

**** A mes frères et mes sœurs et surtout ma sœur
jumelle Nihad*

**** A Mes meilleures amies :*

*Nawel, Meriem, Ferial, Ahlem, Amina, Khaoula, Assia,
Ghada, Ibtissam, Habiba, hanna.*

**** A toutes mes amies, lesquelles ont partagée des bons
moments de bonheur et moment les plus difficiles pendant
toute la période passée aux études.*

**** A toute ma famille*

**** A tous mes enseignants(es) et plus spécialement
Mme. Kara-Ali Wahiba, mon maître de mémoire qui n'a pas
ménagé d'efforts pour l'aboutissement de ce travail.*

Manel

Remerciements

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».

*Avant toute chose, je remercie **Dieu**, le tout **puissant**, pour m'avoir donnée le pouvoir, la force et la patience ...*

*J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à mon encadreur **Mme KARAAALI Wahiba** ... Merci d'avoir acceptée de diriger ce travail, Merci pour votre encadrement sans faille tout au long du période de réalisation de ce travail. C'est un très grand honneur et un très grand plaisir d'avoir pu faire votre connaissance avant tout...*

*Je remercie **Mr BOUFENNARA Souhil** D'avoir accepté de juger mon travail en tant que président.*

*Je remercie **Mr BOUSSAA Abd El halim**, maître de conférences. D'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*A **Nihad, Nawel, Meriem, Ferial, Assia, Amina, Khaoula, Halima** et **Badis Afaf**, je dis merci pour votre disponibilité, votre serviabilité et votre marque de sympathie qui restera à jamais dans ma mémoire.*

*Je remercie tout particulièrement ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes choix, et qui été présente chaque fois que cela a été nécessaire. Merci **Maman**, Merci **Papa**, Merci mes **Sœurs**, mes **Frères**. C'est avec vous que j'ai partagé mes joies, mes peines, vous m'avez soutenu grâce à votre présence, à votre sourire, à votre amitié.*

♥Merci ♥

Table des matières

Dédicace	
Remerciement	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I. La phytothérapie	
I. La phytothérapie	
I.1. Définition des plantes médicinales.....	03
I.1.1. Définition médicales.....	03
I.1.2. Définition chimique.....	03
I.1.3. Définition biologique.....	03
I.2. Les principes actifs des plantes et leurs activités biologiques.....	03
I.2.1. Les métabolites primaires.....	04
I.2.2. Les métabolites secondaires.....	04
I.2.2.1. Polyphénols.....	05
I.2.2.2. Les flavonoïdes.....	06
I.2.2.3. Les tanins.....	07
I.2.2.3.1. Tanins hydrolysables.....	08
I.2.2.3.2. Tanins condensés.....	08
I.2.2.4. Les coumarines.....	08
I.2.2.5. Les saponines.....	09
I.2.2.6. Alcaloïdes.....	09
I.2.2.7. Les terpénoïdes et les stéroïdes.....	09
II. La plante médicinale étudiée	
II <i>Globularia alypum</i>	
II.1. Description de la plante médicinale.....	11
II.2. Noms vernaculaires.....	12
II.3. Systématique de la plante.....	12
II.4. Répartition géographique.....	12

II.5. Utilisation en médecine traditionnelle.....	12
II.6. Composition biochimique de la plante médicinale.....	13
II.7. Les activités biologiques de la plante.....	15

III. l'inflammation et anti-inflammatoires

III.1. Généralité.....	16
III.2. Les causes de la réaction inflammatoire.....	17
III.3. Phases de l'inflammation.....	17
III.4. Type d'inflammations.....	17
III.4.1. L'inflammation aiguë.....	17
III.4.1.1. La phase vasculaire.....	18
III.4.1.2. Phase cellulaire.....	18
III.4.1.3. Phase de résolution.....	19
III.4.2. L'inflammation chronique.....	19
III.5. Les médiateurs de l'inflammation.....	20
III.6. Les pathologies inflammatoires.....	22
III.6.1. L'athérosclérose.....	22
III.6.2. Allergies.....	22
III.6.3. Myopathies.....	23
III.6.4. Cancer.....	23
III.7. Les anti-inflammatoires.....	23
III.7.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	23
III.7.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens.....	24
III.7.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	25

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Matériel.....	27
I.1. Matériel végétal.....	27
I.2. Réactifs chimiques et instrumentations.....	27
II. Méthodes.....	27
II.1. Préparation de l'extrait méthanolique.....	27
II.2. Screening phytochimique.....	29
II.2.1. Mise en évidence des tanins.....	29
II.2.2. Mise en évidence des saponosides.....	29
II.2.3. Mise en évidence des flavonoïdes.....	30
II.2.4. Mise en évidence des composés réducteurs.....	30

II.2.5. Mise en évidence des coumarines.....	30
II.2.6. Mise en évidence des alcaloïdes.....	30
II.2.7. Mise en évidence des anthraquinones.....	30
II.2.8. Mise en évidence des quinones libres.....	31
II.2.9. Mise en évidence des sucres réducteurs.....	31
II.2.10. Mise en évidence des amines.....	31
II.2.11. Mise en évidence des terpénoïdes.....	31
II.2.12. Mise en évidence des composés phénoliques.....	31
II.3. Spectres UV-vis des flavonoïdes dans le méthanol de l'EMGA.....	31
II.4. Dosage des flavonoïdes.....	31
II.5. Chromatographie sur papier.....	32
II.5.1. Protocole de Chromatographie sur papier Whatman N° 1.....	32
II.5.2. Calcul du Rapport frontal.....	32
II.6. Activité anti-inflammatoire <i>in VITRO</i>	32
II.7. L'analyse statistique.....	33

Chapitre III : Résultats et Discussion

I. Le rendement de l'extrait.....	34
II. Tests de mise en évidence de certains composés phytochimiques.....	34
III. Spectres UV-vis des flavonoïdes dans le méthanol de l'EMGA.....	36
IV. Dosages des flavonoïdes.....	36
V. Les résultats de la Chromatographie sur papier.....	37
VI. l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> par la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines.....	39

Conclusion et perspective.....	41
---------------------------------------	-----------

résumé

Annexe

Références bibliographiques

Liste des abréviations

ACTH : Hormone corticotrope hypophysaire ou adrénocorticotrophine.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens.

BAW : Butanol/acide acétique/eau distillée (water).

BSA : Sérum albumine bovine.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

COX : Cyclo-oxygénases.

GR : Glucocorticoïdes récepteurs.

HHDP : L'acide hexahydroxydiphénique.

IL-1 : L'interleukine 1.

LOX : Lipoxygénases.

PAF : Facteur activateur des plaquettes.

PGE2 : Prostaglandin E2.

PMNs : Les polynucléaires neutrophiles.

Rf : Rapport frontal.

TNF : Tumor necrosis factors.

UV-vis : Ultraviolet-visible.

LISTES DES FIGURES

N° de figure	Titre	N° de page
01	Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie, certains principes actifs sont des métabolites primaires, d'autres sont des métabolites secondaires.	04
02	Squelette de base des flavonoïdes.	07
03	<i>Globularia alypum</i> (arbuste et feuilles).	11
04	Mécanisme d'action des AINS.	24
05	La carte géographique du Jijel.	27
06	Préparation de la poudre végétale.	28
07	Les différentes étapes de l'extraction d'EMGA.	29
08	Le spectre d'absorbance UV-vis d'EMGA.	36
09	La courbe d'étalonnage de la quercétine.	37
10	Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait butanolique de <i>G. alypum</i> par chromatographie sur papier par le système solvant : Butanol /acide acétique/eau distillée (4/1/5) (révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$.	38

LISTE DES TABLEAUX

N° de tableau	Titre	N° de page
01	Structure des squelettes des polyphénols.	06
02	Etudes antérieures sur l'espèce <i>Globularia alypum</i> .	14
03	Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires.	21
04	Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires.	26
05	Le rendement d'extrait méthanolique de <i>G. alypum</i> .	34
06	Analyse phytochimique préliminaire d'extrait méthanolique de <i>G. alypum</i> (EMGA).	35
07	Résultat de la CCM de l'extrait butanolique de <i>G. alypum</i> , Système solvant : Butanol /acide acétique/ water (4/1/5) Adsorbant : papier Whatman.	38
08	Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines à 3 types de concentrations pour l'EMGA et le médicament.	39

Introduction

Introduction

La réaction inflammatoire est la première réaction de défense de l'organisme. Sans celle-ci, aucune survie n'est possible. En effet, elle a pour rôle de détecter un agent agresseur, de l'éliminer de l'organisme, et est également indispensable à la réparation d'un tissu endommagé. S'il est mal régulé, ce mécanisme peut cependant devenir néfaste pour l'organisme [1] et peut engendrer des dommages irréversibles. Une réponse insuffisante conduit à une immunodéficience pouvant entraîner une infection secondaire ou même un cancer. Exacerbée, au contraire, elle augmente la morbidité et la mortalité dans des pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou encore le diabète. Mal contrôlée, l'inflammation peut s'étendre au reste de l'organisme via la circulation sanguine. Elle peut alors conduire à des dommages tissulaires irréversibles locaux ou généralisés, parfois à un choc septique entraînant dans les cas les plus graves le décès [2,3]. Cependant, l'utilisation de substances chimiques de synthèse anti-inflammatoires est accompagnée toujours d'effets secondaires indésirables, alors que l'utilisation de composés photochimiques s'avère utile et sans effets secondaires.

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés : les métabolites secondaires [4]. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante.

L'Algérie est considérée parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique vu sa position biogéographique privilégiée et son étendue entre la Méditerranée et l'Afrique subsaharienne. La flore algérienne compte près de 3 000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15 % sont endémiques [5]. Parmi ces plantes, on peut citer la plante *Globularia alypum*, plante sauvage appartenant à *Globulariaceae* famille. C'est un arbuste pérenne qui se trouve dans toute la région méditerranéenne [6]. Ses feuilles sont traditionnellement utilisées comme agent hypoglycémique, laxatif, cholagogue, stomacométrique, purgatoire et sudorifique [7]. Elle est également utilisée dans le traitement des maladies cardiovasculaires et les maladies rénales... etc. Et qui a constitué le sujet de plusieurs études qui font déterminer leurs compositions chimiques ainsi que les propriétés biologiques [8,9].

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de *Globularia alypum*. Pour cela, notre objectif consiste à la préparation de l'extrait méthanolique de

la partie aérienne de *Globularia alypum* et l'effet anti-inflammatoire de cet extrait *in vitro* par la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons jugé utile de structurer le manuscrit comme suite : outre l'introduction et la conclusion générale, il est structuré en trois chapitres. Le premier chapitre est une synthèse bibliographique dans laquelle sont abordés trois parties : la phytothérapie, la plante choisie et l'inflammation et les anti-inflammatoires.

Le deuxième chapitre est expérimentale dans lequel sont abordés deux parties ; la première présente le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour préparer l'extrait brut méthanolique, l'identification et la quantification des flavonoïdes contenus dans cet extrait et enfin l'évaluation *in vitro* du pouvoir anti-inflammatoire de cet extrait par la méthode de la dénaturation des protéines et la deuxième partie expose les résultats obtenus suivis de la discussion.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

I. La phytothérapie

Définition

La phytothérapie, du grec phyton qui veut dire plante therapeia, [10] elle fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces. Elle s'agit d'une des premières manifestations de l'effort immémorial de l'homme pour comprendre et utiliser la nature afin de traiter et prévenir les maladies par l'usage des plantes [11].

I.1. Définition des plantes médicinales

On qualifie de plante médicinale toute plante possédant des propriétés agissant sur l'organisme humain ou animal de façon bénéfique. Les plantes médicinales sont utilisées en médecine naturelle. Généralement, seule une partie de la plante est utilisée, que ce soit le bulbe, les racines, les feuilles, les graines, les fruits ou les fleurs. La branche de la médecine qui utilise des plantes médicinales est appelée phytothérapie. Parmi les principes actifs les plus courants des plantes médicinales, on peut nommer les polyphénols, les terpènes, les stéroïdes et les alcaloïdes [12].

I.1.1 Définition médicales

Ce sont des plantes inscrit à la pharmacopée, et qui sont considéré comme des médicaments, leur vente est exclusivement réservée aux pharmaciens, et aux herboristes [13].

I.1.2. Définition chimique

Les plantes médicinales sont des plantes possédant des molécules à l'intérieur de leur organe (feuilles, fleurs....etc.) et pouvant selon des technique chimique (extraction, distillation ...) permettent à l'isolation des principes éléments actifs (huiles, alcool...) pour des buts thérapeutiques [14].

I.1.3. Définition biologique

Les plantes médicinales sont des végétaux connus pour leurs pouvoirs bienfaiteurs ; dont l'un de ces organes comme l'écorce, fruits ... etc. possédants des vertus curatives [15].

I.2. Les principes actifs des plantes et leurs activités biologiques

Les produits naturels des plantes peuvent être classés en deux catégories, les métabolites primaires et les métabolites secondaires :

I.2.1. Les métabolites primaires

Les plantes utilisent l'énergie du rayonnement solaire, le dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère, l'eau et les éléments inorganiques du sol qu'elles absorbent par les racines (eau, éléments inorganiques) et par les feuilles (dioxyde de carbone). Le processus de base est la photosynthèse qui fixe le carbone contenu dans le dioxyde de carbone atmosphérique, en le combinant aux atomes d'hydrogène contenus dans les molécules d'eau. Les premiers produits formés par la photosynthèse sont des hydrates de carbone, de faible masse moléculaire (oses). C'est à partir de ces oses (ou sucres) que sont ensuite formés tous les métabolites primaires nécessaires à la survie de la plante : glucides complexes (polymères comme la cellulose, l'amidon ou les pectines), acides aminés (constitutifs des protéines), acides gras (constitutifs des lipides), etc. (**Figure 1**) [16].

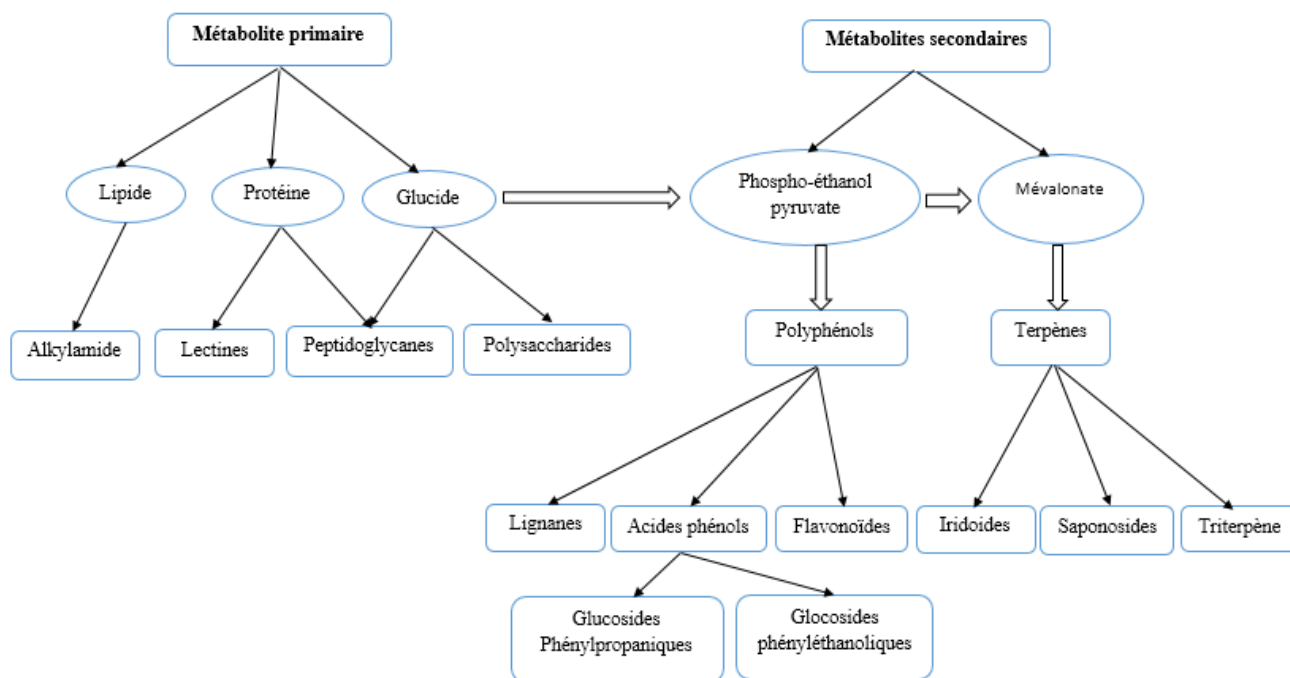


Figure 1 : Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie, certains principes actifs sont des métabolites primaires, d'autres sont des métabolites secondaires [16].

I.2.2. Les métabolites secondaires

On désigne par « métabolite secondaire » toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante. Pour ce qui concerne leurs fonctions chez les plantes, les métabolites secondaires exercent un rôle majeur dans l'adaptation des

végétaux à leur environnement [17]. Ils sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes.


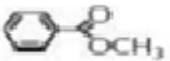

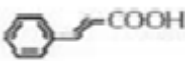
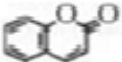


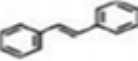
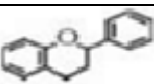
I.2.2.1. Polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux [16,18]. Présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits, [19] et constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus [18]. Ils sont caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside, les acides organiques...etc [16,18].

Ils sont produits par les plantes afin d'accomplir des fonctions précises, les plus notoires étant : Défense contre les moisissures et les bactéries phytopathogènes, la résistance à l'attaque des insectes et l'attraction des pollinisateurs [20].

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones [21] en plusieurs classes : Les flavonoïdes, Les acides phénoliques de types benzoïques ou cinnamiques, les tanins, les hydrolysables ou condensées, Les stilbenes, les lignines et les subérines, (**Tableau 1**). Ces classes montrent une extrême variété d'activités biologiques et thérapeutiques [22]. Tels que; des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux [23], anti-allergènes, vasodilatateurs [24] et antioxydants[25] . Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également en étude clinique comme des antiagrégants plaquettaire, ou hypotenseur [26].

Tableau 1 : Structure des squelettes des polyphénols [21].

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénonnes	Gallacétophénonnes	
8	C6-C2	Acides phénylacétiques	Acide p-hydroxyphényl acétique	
9	C6-C3	Acides hydroxycinamiques	Acide Caumarique	
9	C6-C3	Caumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	xanthones	Mangiférine	
14	C6-C2-C6	stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	flavonoïdes	Naringénine	

I.2.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [27] ; au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bêtaïnes [28]. On les trouve dissous dans la vacuole des

cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers et des chromoplastes [27]. Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes [29] et leur nombre ne cesse d'accroître. Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane (C6-C3-C6) ; les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (**Figure 2**) [30].

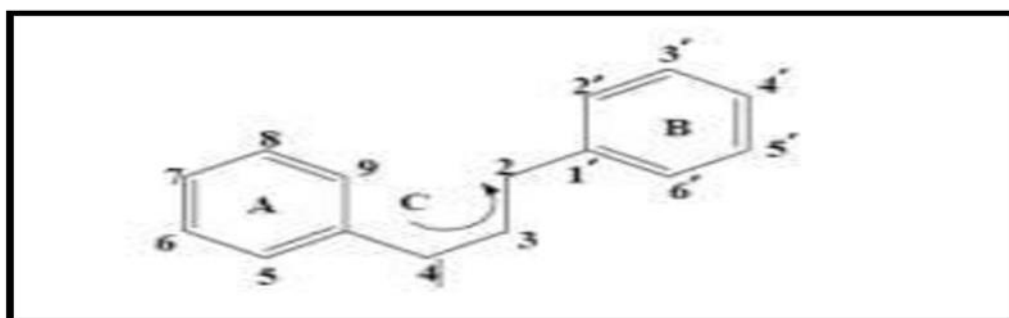


Figure 2 : Squelette de base des flavonoïdes [31].

De [30] ont classé les flavonoïdes en 6 familles qui impliquent les flavonols, les flavones, les flavanes, les isoflavones, les anthocyanines et les flavanols. Au sein de ces six familles, deux types de structures ont été relevés, celui des flavonoïdes au sens strict dont la structure porte le noyau aromatique B en position 3 sur la chaîne C3 et celui des isoflavonoïdes dont le noyau aromatique B est en position 2 sur la chaîne C3.

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antivirales [32], anti carcinogènes [33], anti-inflammatoires [34], hypotenseurs, diurétiques [35] et antioxydantes [36]. Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire [37]. Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires [38].

I.2.2.3. Les tanins

Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Ils sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux [39]. On distingue : les tanins hydrolysables et condensés.

I.2.2.3.1. Tanins hydrolysables

Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre, généralement le glucose, et d'un nombre variable d'acide phénolique qui est l'acide gallique dans le cas des tanins galliques ou l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés dans le cas des tanins éllagiques [16].

I.2.2.3.2. Tanins condensés

Les tanins condensés, dits aussi : proanthocyanidines sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols [40]. Ils sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre [41].

Plusieurs observations, chez les humains comme chez les animaux des laboratoires suggèrent que les tannins exhibent un large spectre de propriétés pharmaceutiques, thérapeutiques et chimioprotectrices dues à leur propriété anti radicalaire [42].

En effet, les tannins protègent contre les toxicités induites par différents agents (hydrogène peroxyde, acétaminophène, extraits contenus dans la fumés du tabac...), contre l'hypercholestérolémie et les changements de la formule sanguine. Ils jouent aussi un rôle dans la prévention contre les deux formes de mort cellulaire connues, apoptose et nécrose, diminuant ainsi les dommages causés dans l'ADN lors de ces deux dernières. L'action cytoprotectrice des proanthocyanidines est supérieure à celle des vitamines C, B et bêta-carotène [43].

I.2.2.4. Les coumarines

Les coumarines ont été isolées pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata*. Ils sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone et ils sont classés en coumarines simples, furanocoumarines et pyranocoumarines.

Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes. Dans les plantes, on les rencontre chez les *Apiacées*, les *Astéracées*, les *Fabacées*, les *Rosacées*, les *Rubiacees*, les *Rutacées* et les *Solanacées* [44].

La coumarine et ses dérivés ont des actions phyto biologiques [45], bactériostatiques et anti fongiques [46]. Ils ont un effet antiœdémateux [47].

I.2.2.5. Les saponines

Le nom saponine dérive du mot latin «sapo», qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires explique leur comportement moussant en solution aqueuse. Comme définition, on dirait qu'une saponine est un glycoside de stéroïde ou de triterpène. Fondamentalement, on distingue les saponines stéroïques et les saponines triterpéniques [48]. Ces molécules sont connues pour leur propriété tensio-active ou encore leur capacité à lyser les globules rouges (hémolyse) [49].

I.2.2.6. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées à propriétés basiques ou amers [50] ayant des structures très diverses et dérivent de différents acides aminés ou de l'acide mévalonique en passant par différentes voies biosynthétiques [51]. La source principale des alcaloïdes était auparavant les plantes florales mais plusieurs composés de cette famille ont été récemment extraits des règnes animaux à savoir les insectes et les poissons. Malgré cet avancement, les alcaloïdes floraux restent les plus importantes par rapport aux autres [52,53]. En général les alcaloïdes ne se concentrent pas dans une seule partie de la plante. Ils se présentent avec des concentrations différentes dans les tiges, les fleurs, les racines et les feuilles. Cette même concentration se diffère selon la période de récolte [52,53]. Leur rôle dans la plante reste encore moins clair. Probablement ils sont considérés comme une réserve d'azote en cas de son manque dans le sol [16,54].

Les alcaloïdes figurant parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine [55], où ils sont utilisés contre le cancer et les troubles nerveux comme la maladie de Parkinson. Cependant certains alcaloïdes possèdent des propriétés toxiques comme l'atropine qui est un poison dangereux mortellement toxique extraite d'*Atropa belladonna*, néanmoins il est utilisé à faible dose dans une optique thérapeutique [56].

I.2.2.7. Les terpénoïdes et les stéroïdes

Les terpénoïdes sont une vaste famille de composés naturels et de caractère généralement lipophiles, leurs grandes diversités due au nombre de base qui constituent la chaîne principale de formule $(C_5H_8)_n$ selon la variation de nombre n , on peut les classer en composés monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, ... [57]. Ces molécules présentent en forme des huiles essentielles, des parfums, des pigments (carotène), des hormones (acide abscissique), des stéroïdes (cholestérol) [58].

Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques, possèdent moins de 30 atomes de carbone, synthétisés à partir d'un triterpène acyclique [58].

Chez toutes les plantes on trouve ces composés liés avec un groupement alcool qu'ils nommés les stérols ; prenant une forme plane, glycosylée, ce sont des analogues du cholestérol qui ne diffèrent de celui-ci que par leur chaîne latérale comme : B-Sitostérol et Stigmastérol [58].

II. La plante médicinale étudiée

Globularia alypum

II.1. Description de la plante médicinale

Globularia alypum (*G. alypum*) est une plante vivace d'une hauteur allant de 30cm à 1m, avec des tiges brun-rouge striées, des feuilles persistantes très nombreuses, coriaces, alternées, généralement spatulées et mucronées, et des fleurs bleues ou pourpres caractéristique des régions méditerranéennes (Algérie, Maroc, Grèce...), surtout à l'ouest de bassin méditerranéen, où elle pousse dans les lieux rocaillieux broussailleux secs, de préférence sur du calcaire. Fréquemment, ces buissons poussent sur de gros rochers isolés ou sur des falaises [59]. Son nom *Globularia* fait référence à la forme globuleuse de l'inflorescence.

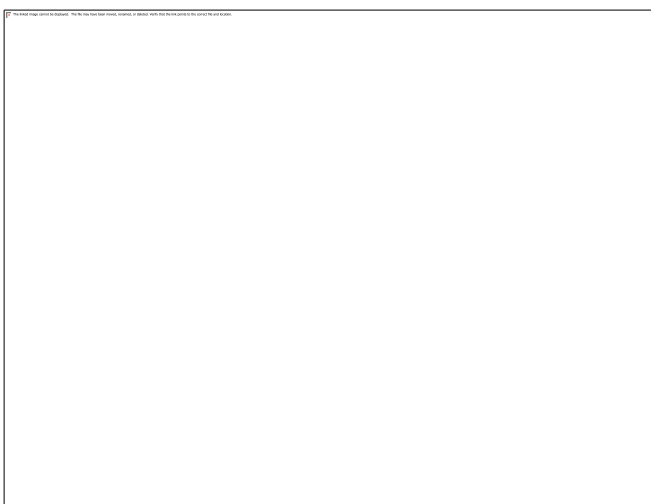


Figure 3 : *Globularia alypum* (arbuste et feuilles) [60, 61,62].

II.2. Noms vernaculaires

G. alypum appelée communément en :

Arabe : tasselgha, Ain larnab تاسلغا, عين لرناب.

Français : Globulaires turbith, Séné de Provence, Herbe terrible.

II.3. Systématique de la plante

Embranchement : *Spermaphyta*

Sous-Embranchement : *Angiosperme*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous classe : *Asteridae*

Ordre : *Scrophulariales*

Famille : *Globulariaceae*

Genre : *Globularia*

Espèce : *Alypum.L*

Classification selon [63, 64].

II.4. Répartition géographique

Cette plante originaire de sud de l'Europe sur le pourtour méditerranéen jusqu'en Grèce, Afrique du nord (Algérie, Maroc jusqu'au Sahara) et Asie mineure (Egypte, Arabie) en forêts, dans les terrains rocailleux [65]. La période de la floraison se situe en hiver au début du printemps (janvier à mars/avril).

II.5. Utilisation en médecine traditionnelle

La plante est connue pour son utilisation dans la pharmacopée traditionnelle comme hypoglycémiant, laxatif doux, dépuratif, antidiabétique, cholagogue, antimycosique, cicatrisant, stomachique et sudorifique. Elle est également employée dans le traitement de maladies cardiovasculaires et rénales [66].

Son nom, *Alypun*, littéralement « qui calme la douleur », signe que cette plante a été autrefois utilisée dans la médecine populaire. Les pharmacopées traditionnelles méridionales utilisent les feuilles de *G. alypum* en infusion pour leurs supposées propriétés antidiabétiques, astringentes, antirhumatismales, purgatives, stimulantes, antiulcéreuses et anticancéreuses [59].

II.6. Composition biochimique de la plante médicinale

L'étude de la composition chimique de la plante a été réalisée dans un but de découvrir les principaux produits naturels responsables de ces différentes activités thérapeutiques. Plusieurs métabolites secondaires ont été mis en évidence. Les études réalisées sur cette plante sont résumées dans le (**Tableau 2**).

G. alypum contient une quantité importante de composés phénoliques (120mg/g d'extrait) [59]. De plus des études phytochimiques sur l'extrait de *G. alypum* ont permis la séparation et l'identification de composés, tels que le syringin, les phényléthanoides, quatre flavonoïdes et six iridoïdes [66].

Tableau 2 : Études antérieures sur l'espèce *G. alypum*.

Chercheurs (année)	Parties étudiées	Les produits isolés de la plante	Références
Sanchez (1933) Espagne		- Acide cinnamique. - Acide pyrocatechuique.	67
Bernard, P. (1974) France	Feuilles	- Globularine. - Acide cinnamique. - Catalpol. - Acide caffeique. - Rutine. - Acide ferulique. - Luteoline 7-glucoside. - Acide p-coumarique. - Acide chlorogenique.	68
Chaudhuri R.K. (1979 et 1981) Suisse	Plante entière	- Globularimine. - Globularine. - Globularinine. - Catalpol. - Globularidine. - Liriodendrine. - Globularicisine. - Syringine.	69,70
Benhassine B. (1982) Tunisie	Plante entière	- 4',7-dihydroxyflavone. - Apigenine-7-gucoside. - Quercetol. - Luteoline-7-glucoside. - 8-C-glucosyl-4', 7-dihydroxyflavone. - La bayine. - Rutoside. - Cyanidine. - Peonidine. - Acide vanillique. - Acide syringique. - Acide caffeique. - Acide sinapique. - Acide p-coumarique. - Acide ferulique. - Acide b-resorcylique.	71,72
Louis S. (1999) France	Feuilles	Globularine.	73
N.E-S Safi (2006)	La partie aérienne	- Globularine. - Globularicisine. - Globularidine. - Golbularinine. - Globularimine. - Globularioside.	66
A. Boutiti (2008) Algerie	Plante entière	- Apigenin. - Luteolin. - Acide p-coumarique. - Acide coumarique.	74

II.7. Les activités biologiques de la plante

La plante est connue pour ses utilisations dans le système indigène de la médecine pour des fins diverses. De nombreuses études chimiques ont révélé que la plante médicinale *G. alypum* riche en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, le syringin, les phényléthanoides et iridoides. Ces composés chimiques montrent une extrême variété d'activités biologiques. Tels que ; l'activité antioxydante, antimicrobienne [75] et anti-inflammatoires [76]. Ainsi elle est utilisée comme anti-cholinestérase ce qui suggère qu'elle pourrait être utilisée dans la maladie d'Alzheimer [76], elle est également utilisée pour le traitement des maladies cardiovasculaires, rénales et peut causer une hypoglycémie significative chez les rats par voie orale et intra péritonéale. Elle réduit l'histamine et la sérotonine *in vitro* [66]. Cependant, différents extraits de *G. alypum* étaient des sources importantes de composés avec des activités antitoxiques et anti-tuberculose. En outre, *G. alypum L.* exerce une activité antiulcéreuse contre les dommages muqueux gastriques causés par l'indométhacine. Récemment, des études ont montré que l'extrait aqueux de *G. alypum* a un effet bénéfique sur les triglycérides plasmatiques et donne une perspective prometteuse pour le traitement de l'hypertriglycéridémie. De plus, chez les rats nourris avec un régime à forte teneur en fructose, *G. alypum* est efficace en abaissant la peroxydation lipidique et en améliorant les enzymes antioxydantes [77].

III. L'inflammation et les anti-inflammatoires

III.1. Généralité

L'inflammation est un processus physiologique de défense non spécifique de l'organisme contre une agression qui entraîne une altération tissulaire, Elle permet la mise en place d'une défense à large spectre. En effet, les micro-organismes pathogènes rencontrés chaque jour par un individu sain ne causent qu'occasionnellement une maladie car ils sont détectés et détruits rapidement par des mécanismes de défense innés. La fonction première de la réponse inflammatoire est d'éliminer ou d'isoler l'agent agresseur (bactérie, virus, tissu lésé) du reste de l'organisme et de permettre, le plus rapidement possible, la réparation des tissus, cette réponse dénommée inflammation aigue, est un phénomène bénéfique pour l'organisme qui peut ainsi retrouver son intégrité physiologique. Parfois l'inflammation peut être néfaste quand cette dernière se pérennise et devient chronique [78] du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalie de régulation du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation [79]. Dans ce cas, la réaction inflammatoire devient défavorable et doit être contrôlée par des traitements médicamenteux [78].

L'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé. Les tissus dépourvus de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète. Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire mais ils peuvent être altérés par l'agression qui déclenche l'inflammation puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation [79].

L'inflammation est impliquée dans de nombreuses maladies incluant non seulement des pathologies articulaires mais aussi les maladies cardio-vasculaires ou les cancers. L'inflammation est caractérisée par des niveaux élevés de métabolites de l'acide arachidonique qui sont produits à travers deux voies enzymatiques différentes, celles des cyclo-oxygénases (COX) et des lipoxygénases (LOX). A partir de l'acide arachidonique, les COX vont permettre la production des prostaglandines et de thromboxanes, tandis que les lipoxygénases (LOX) vont synthétiser les leucotriènes, les lipoxines et les acides eicosatétraénoïques. Les leucotriènes sont de puissants médiateurs inflammatoires liés à l'allergie qui ont un rôle important dans les réactions allergiques mais, également, dans l'ischémie, les accidents cérébro-vasculaires ou la maladie d'Alzheimer [80].

III.2. les causes de la réaction inflammatoire

Les causes de la réaction inflammatoire sont multiples et représentent les agents pathogènes, ces causes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation :

- Infection contamination par des micro-organismes (Bactérie, virus, parasites, champignons).
 - Agents physiques : Traumatisme, chaleur, froid, radiations.
 - Agents chimiques : Caustiques, toxines, venins.
 - Défaut de vascularisation : Réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par ischémie.
 - Agression dysimmunitaire (Anomalie de la réponse immunitaire, allergies, auto-immunité...)
- [81].

Quelle que soit la nature du facteur déclenchant, les manifestations de la réponse inflammatoire seront les mêmes. C'est l'intensité des manifestations et leur durée qui changent et conditionnent les effets bénéfiques ou délétères de la réaction inflammatoire [78].

III.3. Phases de l'inflammation

La réaction inflammatoire comporte une suite coordonnée d'événements :

-La phase précoce ou phase vasculaire, caractérisée par une vasodilatation artériolaire qui conduit à un érythème, une chaleur locale, une hyperesthésie, et un œdème.

-La phase secondaire ou phase cellulaire, caractérisée par la migration extra vasculaire (diapédèse) et la libération de cytokine qui sont à l'origine de l'activation cellulaire. Il se forme alors des tissus de granulation (granulome).

-La phase terminale ou phase de régénérescence qui correspond à la sclérose du tissu par élimination des débris cellulaires et tissulaires par un mécanisme de phagocytose et de pinocytose [82].

III.4. Type d'inflammations

III.4.1. L'inflammation aiguë

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs

intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante [81].

L'inflammation aiguë est caractérisée par quatre phénomènes typiques qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur. Elle peut également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression [83].

L'inflammation aiguë peut être divisée en trois grandes phases ; une phase vasculaire immédiate (de l'ordre de minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale, une phase cellulaire consécutive caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des micro-organismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et de cicatrisation qui en quelques jours conduira à la restauration des tissus [78].

III.4.1.1. La phase vasculaire

Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire, très brève de quelques secondes. Elle est due à l'action du système sympathique, et est très rapidement ressentie puisque douloureuse, expliquée par la libération d'histamine, de sérotonine et de kinine, l'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux. Cette constriction n'est pas innocente sur les plaquettes présentes dans la circulation, laquelle est perturbée. Ces plaquettes vont alors s'activer. Très vite à cette vasoconstriction, va faire suite une vasodilatation des vaisseaux sanguins. Le débit local est augmenté et la perméabilité des capillaires est exacerbée, ce qui explique l'extravasation des cellules sanguines (diapédèse). Ce qui explique en partie la constitution de la chaleur et de la rougeur. La migration des cellules s'accompagne d'un transfert de plasma qui crée l'œdème [84].

III.4.1.2. Phase cellulaire (recrutement des leucocytes)

L'exsudation plasmatique permet l'apparition de plusieurs substances dans les espaces extravasculaires : anticorps, substances bactéricides, facteurs de coagulation, composants du complément, kininogènes, interleukines, interférons et des dérivés de l'acide arachidonique. Ceci conduit à un afflux extravasculaire des leucocytes attirés par les chimio-attractants existants dans l'exsudat et ceux libérés au niveau du site enflammé [85]. La première étape de cet afflux consiste en une marginalisation des leucocytes grâce à l'expression d'adhésions (intégrines, sélectines, membres de la superfamille des immunoglobulines) au niveau des cellules endothéliales et des leucocytes activés [86]. Ceci permet l'interaction entre l'endothélium et les phagocytes du sang,

principalement les polynucléaires neutrophiles (PMNs) et les monocytes, et leur passage à travers les cellules endothéliales contractées sous l'effet de certains médiateurs inflammatoires tel que la bradykinine et certains dérivés de l'acide arachidonique [85]. Guidées par le gradient de concentration des chimio-attractants, les leucocytes parviennent au tissu lésé [78]. Les monocytes achèvent leur différenciation en macrophages et amorcent avec les PMNs la phagocytose des agents extérieurs et/ou des débris cellulaires. De nombreuses protéases (collagénase, élastase) et des radicaux libres dérivés du métabolisme de l'oxygène et du monoxyde d'azote sont produits au cours de la phagocytose. Les effets cytocides locaux de ces produits sont très importants [86].

III.4.1.3. Phase de résolution

La phase de résolution, ou de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. Les agents agresseurs sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Les macrophages vont alors sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire. Le retour à un état physiologique consiste dans un premier temps en la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elle-même, ces cellules pouvant produire et remodeler les éléments de leur stroma (collagène de type I et III) ou de leur lame basale (collagène de type IV et V, laminine). Si l'atteinte est plus sérieuse et entraîne une destruction du tissu atteint, d'autres cellules vont intervenir pour réparer le nouveau tissu, les macrophages vont participer à l'angiogenèse, mais ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaire. Comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour permettre la reconstruction des tissus, le système de l'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre [78].

III.4.2. L'inflammation chronique

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causé par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise, comme dans la polyarthrite rhumatoïde, rejet de l'allogreffe chronique, dans la bérylliose, et dans l'inflammation granulomateuse. Il est prouvé que les macrophages dans ces lésions produisent une série de médiateurs pro-inflammatoires qui activent les fibroblastes pour fixer le collagène et activer les autres macrophages et lymphocytes pour libérer des médiateurs responsables des réponses inflammatoires [87].

Inflammations n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évoluent en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. On peut distinguer deux types de circonstances de survenue des inflammations chroniques :

- les inflammations aiguës évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus (déterSION incomplète) ou lorsqu'une inflammation aiguë récidive de façon répétée dans le même organe en entraînant à chaque épisode des destructions tissulaires de moins en moins bien réparées.
- Les inflammations peuvent parfois se manifester d'emblée sous une forme apparemment chronique. La phase aiguë vasculo-exsudative est passée inaperçue car brève ou asymptomatique. C'est souvent le cas de maladies auto-immunes, ou d'affections où les mécanismes dysimmunitaires sont prépondérants (exemple : hépatite chronique active secondaire à une infection par virus de l'hépatite B ou C) [81].

III.5. Les médiateurs de l'inflammation

On appelle médiateurs de l'inflammation toute molécule pouvant agir sur les acteurs de la réaction inflammatoire et pouvant moduler et réguler la réponse inflammatoire. Ils interviennent ainsi à toutes les étapes de la réaction, que ce soit à l'initiation, pendant la phase aiguë ou lors de la terminaison. Les médiateurs ont souvent une durée de vie courte, leur activation et inactivation permettent la régulation de la réponse inflammatoire. Les médiateurs participent à des réactions en cascade. On peut classer les médiateurs selon leur origine. Ils peuvent être exogènes comme les endotoxines des bactéries essentiellement, ou endogènes d'origine cellulaire (histamine, eicosanoides, cytokines et chémokines) ou d'origine plasmatique (produits des systèmes du complément, de la coagulation et kinines) [88].

Les changements locaux qui surviennent au niveau du site inflammatoire sont le résultat de la formation et/ou la libération séquentielle de médiateurs pro et anti-inflammatoires de nature divers ; amine (histamine et sérotonine), médiateurs lipidiques (prostaglandines et leukotrienes), et des cytokines de nature peptidique, protéique ou glycoprotéique [83]. (**Tableau 3**)

Tableau 3 : Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires [89].

Médiateurs	Origine	Action
Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes.	Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
Sérotonine	Mastocytes et plaquettes.	Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteur activateur des plaquettes (PAF)	Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales.	Assure la vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule la bronchoconstriction, l'agrégation des plaquettes et la libération des médiateurs qu'elles renferment, induit la production des EOR et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages.
Kalicroïne	Présente dans le plasma.	Transforme et active le système des Kinines.
Plasmine	Présente dans le plasma.	Clive le composant du complément C3 pour générer le C3a et le C3b.
Leucotriènes : -LTC4, LTD4, LTE4 -LTB4	-Essentiellement par les leucocytes. -Essentiellement par les leucocytes.	-Augmentent la perméabilité des micro- vaisseaux. -Augmente la perméabilité vasculaire et le flux sanguin local, induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des EOR et attire et active les cellules inflammatoires.
Prostaglandine E2	Essentiellement par les leucocytes.	Provoque la vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, de la bradykinine et des leucotriènes, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur.
Bradykinine	Présente dans le plasma sous forme de kininogènes.	Accroît la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteur de Hageman (XII)	Présent dans le plasma et est activé par l'adhésion des plaquettes.	Impliqué dans la cascade de coagulation.
Thrombine	Présente dans le plasma.	Catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine et induit la libération de la sérotonine des plaquettes.
Fibrine	Présente dans le plasma, formé à partir du fibrinogène.	Intervient dans la formation du caillot sanguin.
IL-8	Monocytes, macrophages, plaquettes et lymphocytes.	Active le chimiotactisme des neutrophiles, des monocytes et des macrophages. Induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des EOR. Intervient dans la réparation tissulaire.

C3a	Fraction C3 du complément inactif.	Provoque la dégranulation des mastocytes.
C5a	Fraction C5 du complément inactif.	Provoque la dégranulation des mastocytes et des neutrophiles, exerce un effet chimiotactique en vers les phagocytes et stimule la contraction du muscle lisse.

III.6. Les pathologies inflammatoires

Les anomalies inflammatoires sont un groupe de troubles qui sous-tendent une grande variété de maladies humaines. Le système immunitaire est souvent impliqué dans les troubles inflammatoires, ont manifesté dans les deux réactions allergiques et certaines myopathies, avec de nombreux troubles du système immunitaire résultant de l'inflammation anormale. Les maladies non-immunes avec origines étiologiques dans les processus inflammatoires incluent le cancer, l'athérosclérose et la maladie cardiaque ischémique [90].

III.6.1. L'athérosclérose

Autrefois considérée comme une maladie de stockage de lipide fœde, implique en fait une réponse inflammatoire en cours. Les progrès récents de la science fondamentale ont établi un rôle fondamental pour l'inflammation dans la médiation de toutes les étapes de cette maladie de l'initiation par la progression et, finalement, les complications thrombotiques de l'athérosclérose. Ces nouveaux résultats fournissent des liens importants entre les facteurs de risque et les mécanismes de l'athérogènes. Des études cliniques ont montré que cette biologie émergente de l'inflammation dans l'athérosclérose applique directement à des patients humains. Altitude dans les marqueurs de l'inflammation prédit les résultats des patients atteints de syndromes coronariens aigus, indépendamment des lésions myocardiques [90].

III.6.2. Allergies

Une réaction allergique, officiellement connu comme hypersensibilité de type 1, est le résultat d'une réponse immunitaire inappropriée déclenchant l'inflammation. Un exemple courant est la fièvre des foins, qui est causée par une réaction d'hypersensibilité par les mastocytes de la peau à des allergènes. Mastocytes sensibilisés pré répondent par dégranulation, libérant des produits chimiques vasoactives telles que l'histamine. Ces produits chimiques se propagent une réponse inflammatoire excessive caractérisée par une dilatation.

Des vaisseaux sanguins, la production de molécules pro-inflammatoires, la libération de cytokines, et le recrutement de leucocytes [91], réponse inflammatoire sévère peut mûrir dans une réponse systémique connue comme l'anaphylaxie.

III.6.3. Myopathies

Myopathies inflammatoires sont causés par le système immunitaire inappropriée attaquer les composants de muscle, ce qui conduit à des signes d'inflammation musculaire. Ils peuvent se produire en association avec d'autres troubles immunitaires, comme la sclérose systémique, et inclure la dermatomyosite, la polymyosite, la myosite et de corps d'inclusion [91].

III.6.4. Cancer

Inflammation orchestre le microenvironnement autour des tumeurs, contribué à la prolifération, la survie et la migration [92]. Les cellules cancéreuses utilisent sélectines, des chimiokines et de leurs récepteurs pour l'invasion, la migration et les métastases [93].

D'autre part, de nombreuses cellules du système immunitaire contribuent à l'immunologie du cancer, en supprimant le cancer [94] intersection moléculaire entre les récepteurs d'hormones stéroïdes, qui ont des effets importants sur le développement cellulaire, et les facteurs de transcription qui jouent des rôles clés dans l'inflammation, tels que NF- κ B, peut médier certains des effets les plus critiques de stimuli inflammatoires sur les cellules cancéreuses [95].

Cette capacité d'un médiateur de l'inflammation pour influencer les effets des hormones Stéroïdes dans les cellules, est très susceptible d'affecter la carcinogenèse d'un côté. D'autre part, en raison de la nature modulaire de plusieurs récepteurs d'hormones stéroïdes, cette interaction peut offrir des moyens pour interférer avec la progression du cancer, en ciblant un domaine de protéine spécifique dans un type cellulaire spécifique [95].

III.7. Les anti-inflammatoires

Ce sont des médicaments qui limitent l'amplitude et la durée des réactions inflammatoires, ils atténuent les signes de l'inflammation [96].

III.7.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et antalgiques. Actuellement, il y a plus de 50 différents AINS sont sur le marché mondial.

Le mécanisme d'action des AINS a été précisé par les travaux de Vane en 1971, il repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la COX, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette caractéristique commune à tous les AINS conduit à une diminution de la production des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), importants médiateurs de l'inflammation (**Figure 3**). Même si d'autres modes d'action existent, cette activité explique largement les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des AINS, mais aussi une partie de leurs effets secondaires en raison du rôle ubiquitaire et des fonctions physiologiques des prostaglandines [97]. Ainsi, la production exagérée de prostaglandines en situation pathologique participe à l'inflammation (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire) et à la douleur (sensibilisation des nocicepteurs) alors que sa production basale permet l'homéostasie tissulaire (production de mucus, de bicarbonates et maintien du flux sanguin sous muqueux gastrique, maintien de l'hémodynamique rénale en cas d'hypoperfusion en particulier). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS semblait donc, jusqu'à récemment, devoir obligatoirement s'accompagner d'effets favorables et délétères [98].

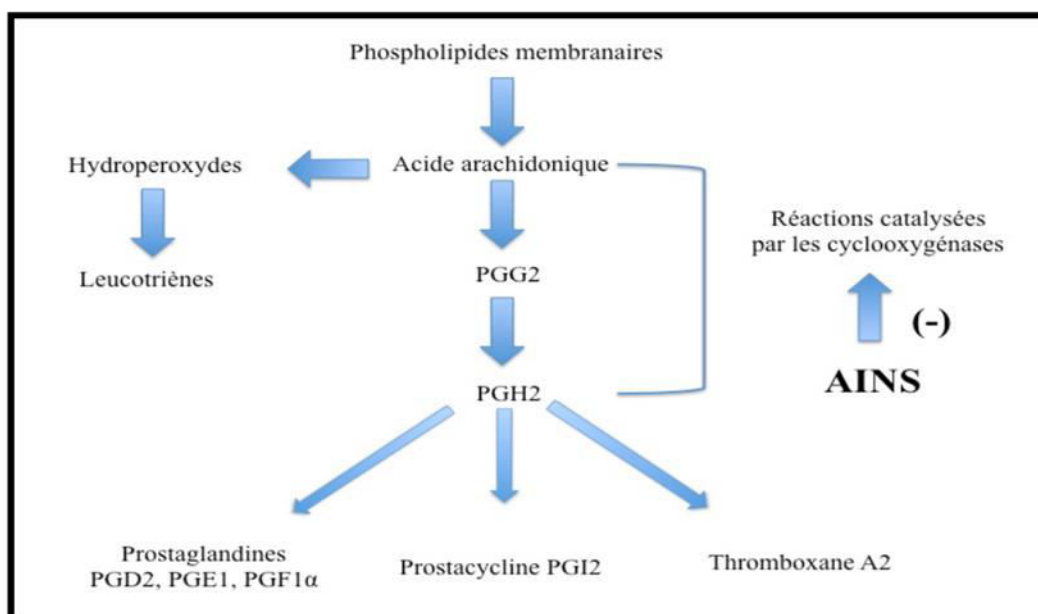


Figure 4 : mécanisme d'action des AINS [97].

III.7.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est stimulée par hormone corticotrope hypophysaire ou

adrénocorticotrophine (l'ACTH) libérée selon un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse.

Dans les tissus cibles, les glucocorticoïdes se fixent à leurs récepteurs des glucocorticoïdes (GR) du cytoplasme de la cellule. Après quoi, le complexe récepteur-ligand formé pénètre dans le noyau cellulaire où il se fixe à de nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes dans la région du promoteur des gènes-cibles. Le récepteur, ainsi fixé à la molécule d'ADN interagit avec les facteurs de transcription basiques, provoquant une augmentation de l'expression génique de gènes-cibles spécifiques. Ce processus est appelé transactivation et conditionne la plupart des effets secondaires métaboliques et cardiovasculaires des glucocorticoïdes.

Le mécanisme opposé est appelé transrépression. Le récepteur hormonal activé interagit avec des facteurs de transcription spécifiques et prévient la transcription des gènes-cibles. Les glucocorticoïdes sont capables d'empêcher la transcription de tous les gènes immuns, incluant celui codant IL-2 [99].

Les glucocorticoïdes ordinaires ne font pas de différence entre la transactivation et la transrépression, et influencent à la fois les gènes immuns "voulus" et ceux "non voulus" régulant les fonctions métaboliques et cardiovasculaires. Actuellement, les efforts de recherche visent à découvrir des glucocorticoïdes agissant sélectivement qui seraient capables de ne réprimer que le système immunitaire.

III.7.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoires. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la COX et la LOX ainsi que par d'autres mécanismes. Quelques exemples de plantes douées d'activités anti-inflammatoires sont cités dans le (Tableau 4).

Tableau 4 : Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires [99].

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Nom commun	Utilisation
<i>Zingiber officinale.</i>	<i>Zingiberaceae.</i>	Rhizome	Gingembre	arthrose, migraine, douleurs rhumatismales.
<i>Helleborus orientalis.</i>	<i>Ranunculaceae.</i>	Racines	Lenten-rose	Cédèmes, douleurs rhumatismales.
<i>Urtica dioica.</i>	<i>Urticaceae.</i>	Feuilles, Racines	Ortie	Rhinite allergique, eczéma goutte, douleurs rhumatismales.
<i>Laurocerasus officinalis R.</i>	<i>Rosaceae.</i>	Feuilles	Laurier	Fièvre, pharyngite, douleurs d'estomac, hémorroïdes.
<i>Curcuma long A.</i>	<i>Zingiberaceae.</i>	Rhizome	Curcuma	Douleurs rhumatismales, lupus systémique, psoriasis, infections rénales.
<i>Nerium oleander L.</i>	<i>Apocynaceae.</i>	Fleure	Laurier rose	Douleurs, maux de tête.
<i>Harpagophytum procumbens.</i>	<i>Pédaliacées.</i>	Tubercule	Griffe du diable	Arthrose, lombalgie, névralgie, maux de tête, fièvre.
<i>Rhododendron ponticum L.</i>	<i>Ericaceae.</i>	Feuilles	Rhododendron pontique	Cédèmes, états grippaux, mal de dents.
<i>Juglans regia L.</i>	<i>Juglandaceae.</i>	Feuilles, fruits	Noyer commun	Douleurs rhumatismales, fièvre, eczéma, Malaria.
<i>Oenothera biennis.</i>	<i>Onagraceae.</i>	Graines	Onagre bisannuelle	Douleurs rhumatismales.

Chapitre II
Matériel et méthodes

Matériel et Méthodes

Le travail expérimental, ayant pour objet l'étude de l'activité anti-inflammatoire d'extrait méthanolique d'une plante médicinale *Globularia alypum*. La partie expérimentale est réalisée au laboratoire de biochimie, **Université Abbés Laghrour - Khenchela-**.

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

L'espèce sélectionnée «*G. alypum*» a été récoltée dans la région de El Milia -wilaya de Jijel- (**Figure 5**) en mars 2017 et identifiée par Pr. N.Khallafalah (Laboratoire de génétique, biochimie des plantes et biotechnologies, Faculté des sciences, Université Mentouri - Constantine, Algérie).

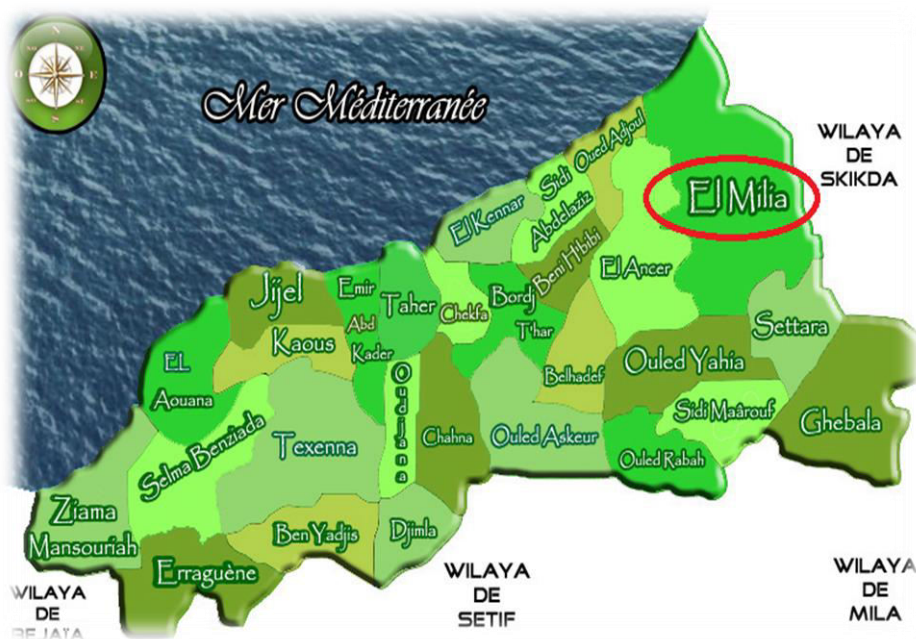


Figure 5 : la carte géographique du Jijel [100]

I.2. Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits : trichlorure de fer (FeCl_3), acide sulfurique (H_2SO_4), acide chlorhydrique (HCl), acide acétique (CH_3COOH), hydroxyde de sodium (NaOH), ammoniacque (NH_4OH), iodure de potassium (KI), di-iode (I_2), chlorure de sodium (NaCl), Chlorure de potassium (KCl), Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4), dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), trichlorure d'aluminium

(AlCl₃), méthanol (CH₃OH), Bovin Sérum Albumine (BSA), quercétine (C₁₅H₁₀O₇), N-butanol (C₄H₁₀O).

Parmi l'appareillage utilisé : Rotavapeur (HAHNVAPOR), spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (JENWAY 6305 UV/VIS), Chambre d'observation UV « 264/365 nm » (VILBER COURMAT), Bain Marie (MEMMERT), Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (MEMMERT), Agitateur magnétique (SCIOLOGEX), vortex (VELP), Ph mètres (Hanna) et Balance (OHAUS).

II. Méthodes

II.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Les parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges) de la plante a été bien nettoyée et séchée à température ambiante et à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil pendant 15 jours. Enfin, la plante sèche a été broyée à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation. La méthode de Markham [101] était suivie pour la préparation d'extrait méthanolique (**Figure 6**), 1779 g de poudre végétale est introduit dans un bécher qui contient le mélange hydroalcooliques ; méthanol /H₂O (7:3) pendant 48 h (macération alcoolique). Cette technique est effectuée 3 fois, suivie chaque fois d'une filtration. Le méthanol est ensuite éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite à 47 °C dans un Rotavapeur (HAHNVAPOR) pour obtenir l'extrait brut méthanolique (**Figure 7**).

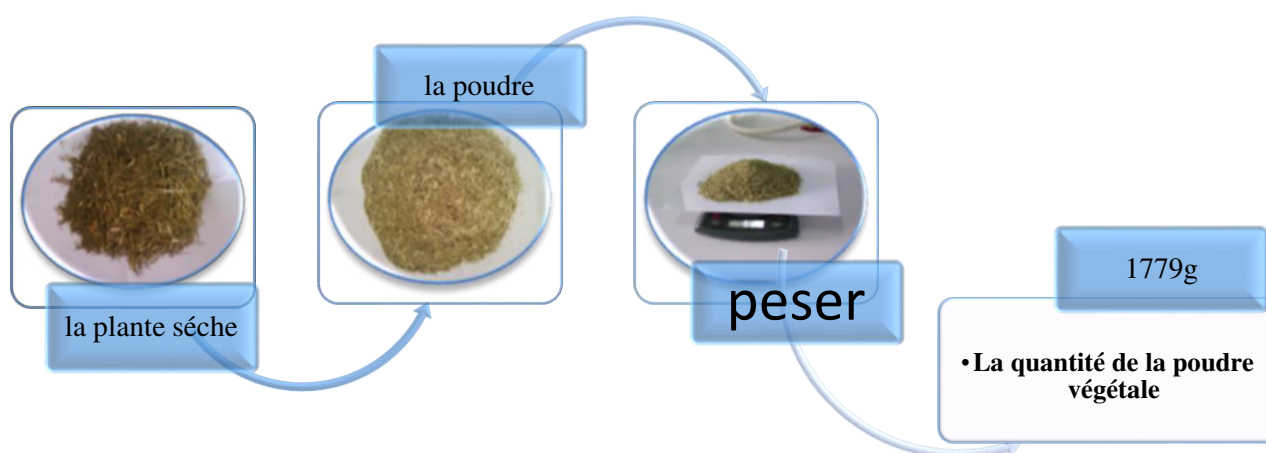


Figure 6 : Préparation de la poudre végétale.

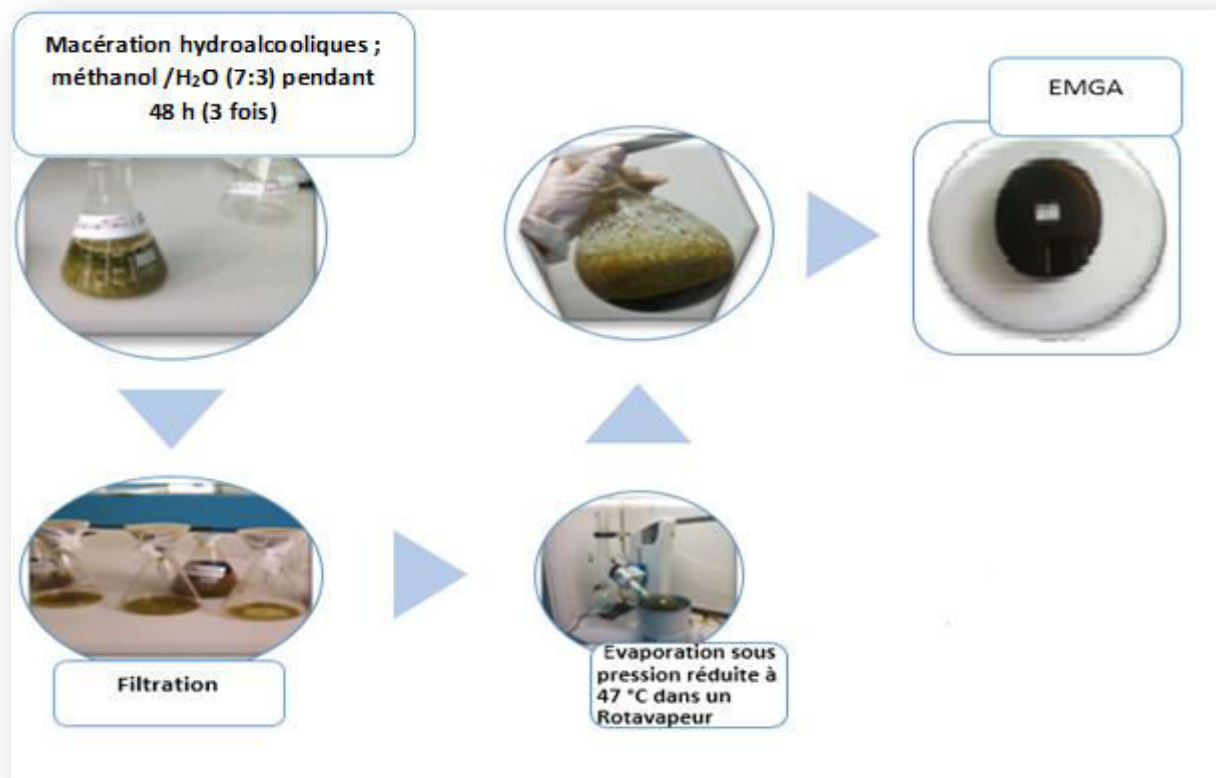


Figure 7 : Les différentes étapes de l'extraction d'EMGA.

II.2. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions de caractérisation qualitatives. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

II.2.1. Mise en évidence des tanins

2 à 3 gouttes de la solution de FeCl₃ à 2%, sont ajoutées à 2 ml de la solution méthanolique de l'extrait. La solution obtenue est reposée pendant quelques minutes. Le test est considéré positif s'il y a l'apparition d'une coloration bleu-noire et un précipité [102].

II.2.2. Mise en évidence des saponosides

- **Test 1** : 5 ml de la solution méthanolique de l'extrait brut sont mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides [102].

- **Test 2** : 5 ml de la solution méthanolique de l'extrait sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques [103].

II.2.3. Mise en évidence des flavonoïdes

Une quantité de quelques milligrammes de l'extrait brut est solubilisée dans 5 ml de CH₃OH, La solution obtenue est traitée avec quelques gouttes d'AlCl₃ (1%). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune [103].

II.2.4. Mise en évidence des composés réducteurs

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani, 5 ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl₃ et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl₃ sont ajoutés à 1 ml de la solution méthanolique de l'extrait. La présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) [103].

II.2.5. Mise en évidence des coumarines

Une quantité de quelques milligrammes de l'extrait brut est solubilisée dans 2 ml d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont :

- La première représente un témoin ;
- La deuxième est traitée avec 0.5 ml de NH₄OH à 10%.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines [104].

II.2.6. Mise en évidence des alcaloïdes

Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. 5 ml d'HCl (2N) sont ajoutés à l'extrait et chauffer dans un bain marie. Après la filtration, le filtrat est traité avec le réactif de Wagner (2g de KI et 1,27g d'I₂ solubilisé dans 100 ml d'eau distillée). La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels [105].

II.2.7. Mise en évidence des anthraquinones

À 10 ml de la solution méthanolique de l'extrait, on ajoute 5 ml de NH₄OH à 10% et on agite. L'apparition de couleur violette indique un test positif [106].

II.2.8. Mise en évidence des quinones libres

Sur un volume de la solution méthanolique de l'extrait, quelques gouttes de NaOH à 1% sont ajoutées. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres [106].

II.2.9. Mise en évidence des sucres réducteurs

On ajoute 1 ml de liqueur de Fehling à 5 ml de la solution méthanolique de l'extrait à tester. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité rouge brique [106].

II.2.10. Mise en évidence des amines

On applique sur papier filtre une goutte de la solution méthanolique de l'extrait. Après séchage à 80°C dans l'étuve, le papier est pulvérisé avec quelque goutte d'une solution de la ninhydrine. Ensuite le papier est séché une 2ème fois dans l'étuve à 110°C pendant 5min, la présence des amines est observée sous forme d'une tache violette [106].

II.2.11. Mise en évidence des terpénoïdes

À 5 ml de la solution méthanolique de l'extrait, on ajoute 2 ml de chloroforme et 3 ml de H₂SO₄ concentrée. La présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase [103].

II.2.12. Mise en évidence des composés phénoliques

100 mg de l'extrait sont mélangés avec 3 ml d'éthanol et 5 gouttes de FeCl₃. Le développement de la coloration bleue verdâtre confirme la présence des composés phénoliques [103].

II.3. Spectres d'absorption UV-vis des flavonoïdes dans le méthanol de l'EMGA

Les spectres UV-vis des flavonoïdes et des glycosides apparentés montrent deux pics d'absorption appelés bande I (300-380 nm) et bande II (240-280 nm). La bande I est associée à la présence d'un système (cinnamoyl) de flavonoïdes B-ring. L'absorption de la bande II est due aux flavonoïdes du système (benzoyl) de flavonoïdes A-ring [107].

II.4. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes d'extrait méthanolique a été quantifié par la méthode du trichlorure d'aluminium [108]; 1 ml d'extrait (préparé dans le méthanol pour avoir des concentrations

convenables) a été ajouté à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2 %, dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans l'extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage $y = ax + b$ établie avec la quercétine à différentes concentrations (0-40 $\mu\text{g} / \text{ml}$, chacune a été préparée dans le méthanol) pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que l'extrait servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes a été exprimé en milligrammes équivalents de quercétine par grammes du poids d'extrait (mg EQ / g E).

II.5. Chromatographie sur papier

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en générale un mélange de solvant, adapté au type de séparation rechercher, et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut gel de silice ou polyamide. Les techniques chromatographiques ne sont pas suffisantes pour identifier un produit mais elles apportent des renseignements (Rapport frontal -Rf- et coloration) susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structures.

II.5.1. Protocole de CCM avec papier Whatman N° 1

L'analyse par chromatographie a été effectuée sur papier Whatman N° 1 sur l'extrait butanolique (voire annexe) de la plante. La solution butanolique de l'extrait est déposée à l'aide d'une micropipette (2 μl) à des points repères à 1.5 cm du bord inférieur du papier. Ensuite, le papier est placé dans les cuves de développement dans lesquelles se trouve un système de solvants approprié appelé phase mobile, à environ 0,5 cm de hauteur. La migration est effectuée par l'utilisation d'éluant suivants : Butanol/Acide acétique/ H_2O (4/1/5).

Après développement dans une cuve en verre et séchage, le papier a été observé sous lampe UV à 254 et 365 nm. Les couleurs des spots ont été enregistrées ainsi de même pour les Rfs [109].

II.5.2. Calcul du Rapport frontal

Pour chaque spot on a calculé le facteur de rétention qui est égal à la distance parcourue par le constituant/ la distance parcourue par le solvant. Ce facteur permet de mentionner une information préliminaire sur la structure des substances flavoniques.

II.6. Activité anti-inflammatoire *in VITRO*

L'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait méthanolique de *G. alypum* a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines [110].

L'activité a été effectuée avec trois concentrations de l'extrait (50µg/ml, 100µg/ml et 250 µg/ml). La méthode consiste à préparer quatre solutions.

- **La solution d'essai** (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (BSA) 0.5 % et 0,05 ml de la solution de l'extrait méthanolique.
- **La solution control test** (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 0.5 % et 0,05 ml d'eau distillée.
- **La solution contrôle produit** (0,5 ml) composé de 0,45 ml d'eau distillée et 0,05 ml de l'extrait méthanolique.
- **La solution standard test** (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 0.5 % et 0,05 ml de la solution de standard Diclofénac sodium.

Toutes les solutions ci-dessus ont été ajustées à pH= 6,3 par une solution HCL (1N),

Les échantillons ont été incubés à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmentée pour garder les échantillons à 57 °C pendant 3 min, après refroidissement des tubes, 2,5 ml de la solution phosphate tampon saline (pH 6,3) a été ajouté aux solutions ci-dessus, l'absorbance a été lue par le spectrophotomètre UV –vis à 255 nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculée comme suit :

ABS de la solution Test-ABS de la solution contrôle produit

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = 100 - \frac{\text{ABS de la solution Test-ABS de la solution contrôle produit}}{\text{ABS de la solution control test}} * 100$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparés avec le Diclofenac sodium (50µg/ml, 100µg/ml et 250 µg/ml).

II.7.L'analyse statistique

Toutes les expériences ont été faites en triple, Les résultats statistiques ont été exprimés en moyenne ± erreur standard de la moyenne (n = 3).

Chapitre III
Résultats et discussion

Résultats et Discussion

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et l'activité anti-inflammatoire d'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante médicinale « *Globularia alypum* ».

I. Le rendement de l'extrait

L'extrait méthanolique (EMGA) a été préparé à partir de poudre de la partie aérienne de *G. alypum*.

Le calcul de rendement de l'EMGA par rapport au poids sec de la poudre végétale de la partie aérienne de *G. alypum* est représenté dans le (Tableau 5).

Tableau 5 : Le rendement d'extrait méthanolique de *G. alypum*.

La plante	Le poids du matériel végétal en (g)	Le poids d'extrait en (g)	Le rendement en (%)
<i>Globularia alypum</i>	1779	365.87	20.56

L'opération de l'extraction du matériel végétale de *G. alypum* à l'aide du méthanol a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brute méthanolique de 365.87 g avec un rendement de 20.56 % (Tableau 5).

La macération est une méthode discontinue, le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée [111]. Il est difficile de comparer les résultats obtenus dans cette étude avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement n'est pas relatif ; il dépend de la méthode d'extraction (à chaud ou à froid), les conditions de séchage (lieu de séchage, la température et la durée de séchage), le stade de croissance et la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité [112,113].

II. Tests de mise en évidence de certains composés phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés sur EMGA révèlent la présence de plusieurs familles de composés dont les résultats sont présentés dans le (Tableau 6).

Tableau 6 : Analyse phytochimique préliminaire de l'extrait méthanolique de *G. alypum* (EMGA).

composés	EMGA
Tanins	+
	Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3min.
Saponosides	-
	L'absence de la formation d'une mousse persistante après 15 min.
Flavonoïdes	+
	Apparition d'une couleur jaune.
Composés réducteurs	+
	Apparition de deux phases, une colorée en brun rouge et la deuxième en bleu-vert.
Coumarines	-
	L'absence d'une fluorescence intense sous la lumière UV.
Alcaloïdes sels	+
	Résultat positif avec le réactif de Wagner (présence de turbidité).
Polyphénols	+
	L'apparition d'une couleur bleue verte.
Les quinones libres	+
	L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violette.
Les anthraquinones	-
	L'absence d'une couleur violette.
Les sucres réducteurs	+
	La présence d'un précipité rouge brique.
Les terpènes	-
	L'absence de l'apparition de deux phases et une couleur marron en interface.
Les amines	±
	La présence des amines et observée sous forme des taches violettes.

Les résultats sont interprétés comme suit : (+) Réaction positive, (±) Trace, (-) Réactions négatives.

L'étude phytochimique de l'EMGA a montré que cette plante contient : des flavonoïdes, des tanins, des composés réducteurs, des alcaloïdes sels, des quinones libres, des sucres réducteurs, des

polyphénols, et des traces des amines. Ce qui confirme les travaux de [59] qui ont été révélés la présence d'une quantité importante de composés phénoliques. De plus des études phytochimiques sur l'extrait de *G. alypum* ont permis la séparation et l'identification de composés, tels que le syringin, les phényléthanoides, quatre flavonoïdes et six iridoïdes [66].

La richesse de l'extrait en composés chimiques actifs pourrait expliquer son utilisation traditionnelle comme un hypoglycémiant, laxatif doux, dépuratif, antidiabétique, cholagogue, antimycosique, cicatrisant, stomachique et sudorifique pour soigner de nombreuses maladies. Elle est également employée dans le traitement de maladies cardio-vasculaires et les maladies rénales [66].

III. Spectres d'absorption UV-vis des flavonoïdes dans le méthanol de l'EMGA

Le spectre d'absorbance UV-vis de l'EMGA (Figure 7) présente deux pics d'absorption à 371 nm et 260 nm qui correspondent à la bande I (Cinnamoyl) et la bande II (Benzoyle) respectivement ce qui caractérise la présence des flavonoïdes.

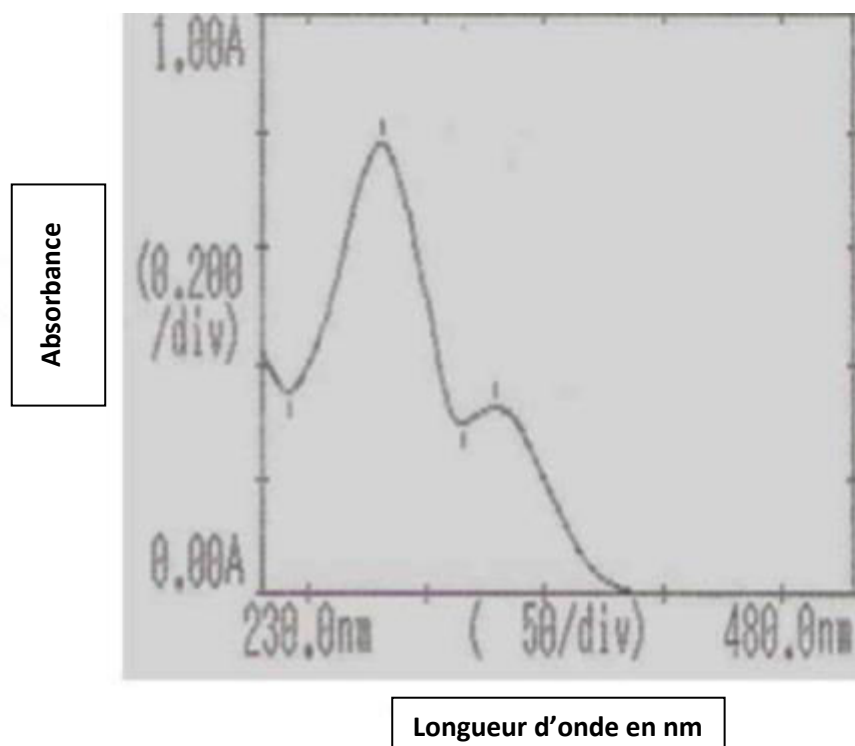


Figure 8 : Le spectre d'absorbance UV-vis d'EMGA.

IV. Dosages des flavonoïdes

L'étude quantitative de l'EMGA au moyen des dosages spectrophotométriques, selon la méthode de trichlorure d'aluminium [108] avaient pour objectif la détermination de teneur des

flavonoïdes totaux. Une courbe d'étalonnage (**Figure 8**) a été tracée pour cet objectif, établie avec la quercétine à différentes concentration. Des mesures de densité ont été réalisées à 430 nm. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent milligramme de quercétine par gramme d'extrait et déterminés par l'équation de type :

$$y = 0.016x + 0.238$$

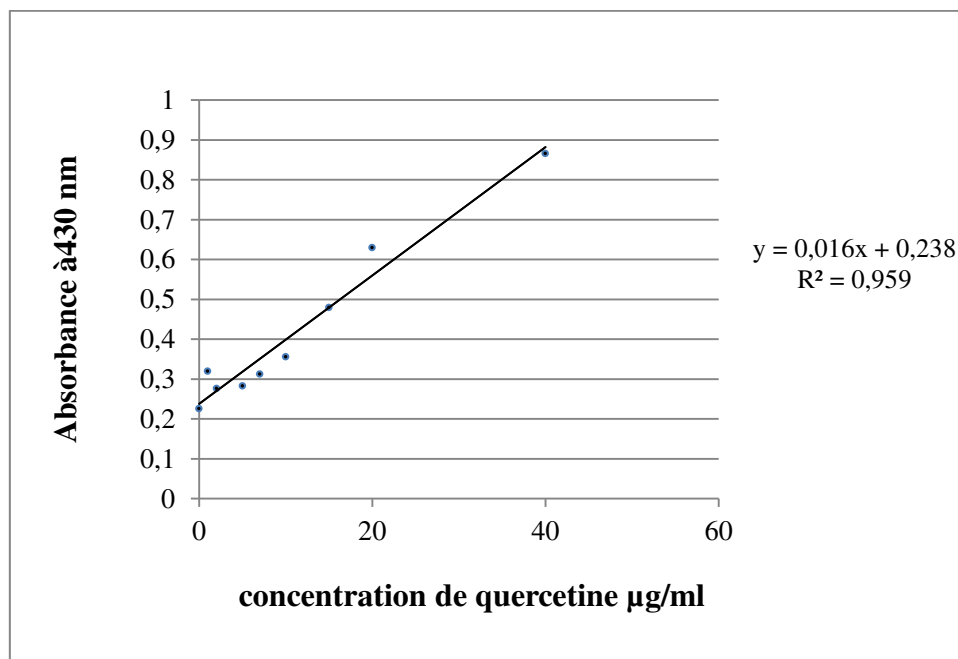


Figure 9 : La courbe d'étalonnage de la quercétine.

La teneur en flavonoïdes d'extrait méthanolique de *G. alypum* exprimés en mg équivalent quercétine par g extrait est de $41,10 \pm 5,81$ mg EQ/gE.

V. Chromatographie sur papier Whatman N°1

Le développement de la méthode pour la CCM commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire, la technique de développement choisie, dimension de la chambre de développement et de l'espace vapeur ont un effet prononcé sur la séparation [111]. La CCM nous a permis d'avoir les empreintes flavoniques dans l'extrait brute des flavonoïdes totaux de la plante *G. alypum* (extrait butanolique) (voir annexe), l'identification des composés était basée sur la comparaison des Rf et couleurs observés sous lampe UV des taches apparues sur papier.

Les résultats sont présentés dans le (**Tableau 7**) et la (**Figure 10**).

Tableau 7 : Résultat de la chromatographie sur papier de l'extrait butanolique de *G. alypum*, Système solvant : Butanol /acide acétique/eau distillée (4/1/5) Adsorbant : papier Whatman.

Couleur sous UV 365 (nm)	Rf (cm)	Type flavonoïde possible	Référence
Marron Foncé (M _F)	0,19	Flavonol ou flavone glycosylés	[114,115]
Bleu (b)	0.41	Acide phénolique et coumarine	[116]
Jaune (j)	0.48	Flavonols	[117,101]
Bleu clair (b _c)	0.72	flavones	[101]
Violet (V)	0.86	Flavones, flavanones et Flavonols méthoxylé	[101]

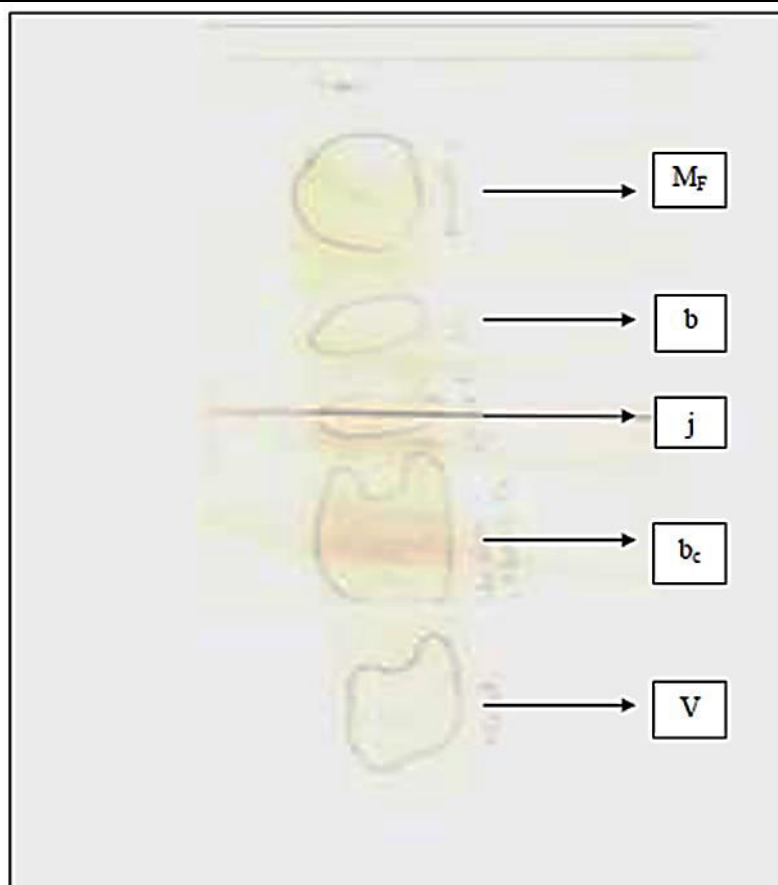


Figure 10 : Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait butanolique de *G. alypum* par chromatographie sur papier par le système solvant : Butanol /acide acétique/ eau distillée (4/1/5) (révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$.

Le (Tableau 7) comporte les Rf des différents spots apparus avec le système solvants utilisés, ainsi que la couleur révélée sous une lampe UV.

Cinq spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait butanolique par le système de solvant utilisé (BAW) appartenant aux différentes classes flavoniques, mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des flavonol et flavone.

VI. l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines

Le (Tableau 8) ci-dessous montre les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait méthanolique de *G. alypum* qui consiste à évaluer les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de BSA.

Tableau 8 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA par l'EMGA et le médicament Diclofénac sodium.

Extrait méthanolique de <i>G. alypum</i> (EMGA) Médicament	Concentration (µg/ml)	% D'inhibition	% Dénaturation
(EMGA)	50	83,74±9,92	16,26
(EMGA)	100	75,51±1,71	24,49
(EMGA)	250	59,81±7,91	40,19
Diclofénac sodium	50	99,39±2,08	0,61
Diclofénac sodium	100	96,25±4,73	3,75
Diclofénac sodium	250	83,46±1,96	16,54

Le test de l'activité anti-inflammatoire par la méthode d'inhibition de la dénaturation de la protéine Bovine Sérum Albumine (BSA) à différentes concentrations a été réalisé en triple, dont les absorbance sont mesurés à 255 nm.

D'après les résultats de (Tableau 8). L'EMGA inhibe la dénaturation de BSA avec des pourcentages d'inhibition de 83.74±9.92, 75.51±1.71 et 59.81± 7.91 respectivement pour les concentrations (50, 100 et 250 µg/ml).

Les résultats obtenus pour cet extrait sont comparables à ceux obtenus pour le Diclofénac sodium, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui exercé des pourcentages

d'inhibition de 99.39 ± 2.08 , 96.25 ± 4.73 et 83.46 ± 1.96 respectivement pour les concentrations (50, 100 et 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (**Tableau 8**).

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation [111,118]. La production d'auto-antigènes dans les maladies anti-inflammatoire peut être due à la dénaturation des protéines *in vitro*. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes et disulfure qui maintien la structure tridimensionnelle des protéines [111,119].

Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme phenylbutazone et l'indomethazine inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires mais inhibent aussi la dénaturation des protéines [120].

D'après les résultats on constate que l'EMGA est capable de contrôlé la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines.

L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA est peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les tannins dans l'extrait trouvés lors des criblages phytochimiques. De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits de plantes sur l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par la méthode de la dénaturation des protéines [120,121, 122 ,123].

D'autres travaux ont prouvés l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait méthanolique des feuilles de *G. alypum* par la méthode de quantification de nitrite [76]. Cette étude Indique que l'extrait de *G. alypum* présente des propriétés anti-inflammatoires via l'inhibition de nombreux médiateurs pro-inflammatoires. Ces données suggèrent que l'extrait de *G. alypum* pourrait être utilisé comme un traitement des maladies inflammatoires.

Conclusion
et
perspectives

Conclusion et perspectives

Malgré le développement de l'industrie des médicaments d'origine chimique, il reste encore des populations qui préfèrent l'utilisation des plantes médicinales pour soigner les diverses maladies. Ce qui nous amène à la conservation de la biodiversité végétale locale. Dans le présent travail, on s'est intéressé aux effets anti inflammatoires de l'extrait brut méthanolique de la partie aérienne de la plante médicinale *Globularia alypum*.

Le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de la plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des tanins, des composés réducteurs, des alcaloïdes sels, des quinones libres, des sucres réducteurs, des polyphénols, et des traces des amines, ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de *Globularia alypum* *in vitro* par le test d'inhibition de la dénaturation des protéines permet de conclure que l'extrait étudié inhibe la dénaturation de Bovin Sérum Albumine.

Les résultats de la présente étude suggèrent que *Globularia alypum* possède des composés ayant des propriétés anti-inflammatoires qui peuvent être utilisées comme des agents anti-inflammatoires dans le développement d'un nouveau médicament pour le traitement de maladies inflammatoires.

Ceci montre que la flore Algérienne peut constituer une réserve importante d'espèces végétales intéressantes, dont les métabolites secondaires peuvent être employés dans plusieurs domaines tels que les industries pharmaceutiques et agroalimentaires.

Cette étude reste préliminaire et plus superficielle, donc, elle nécessite d'autres études approfondies pour mieux se concentrer sur l'effet révélé. Dans ce contexte, et comme perspective on propose de déterminer les métabolites du *Globularia alypum* qui peuvent être responsables de tel effet et le mécanisme absolu par lequel ces métabolites accomplissent leurs rôles.

Résumé

Etude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait méthanolique d'une plante médicinale « *Globularia alypum* »

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique (EM) de la partie aérienne de la plante médicinale *Globularia alypum* par la méthode de la dénaturation des protéines.

L'extrait a été obtenu par macération en utilisant un mélange hydroalcoolique (7:3). Le rendement de l'extraction est de 20.56%. Le screening phytochimique sur l'extrait a montré que cette plante contient : des flavonoïdes, des tanins, des composés réducteurs, des alcaloïdes sels, des quinones libres, des sucres réducteurs, des polyphénols et des traces des amines.

L'étude quantitative a révélé la richesse de cette plante en flavonoïdes avec un teneur de $(41,10 \pm 5,81 \text{ mg/g extract})$.

L'étude qualitative par chromatographie sur papier Whatman n°1 de l'extrait de la plante a montré une diversité remarquable des composés flavoniques susceptibles d'exprimer l'activité recherchée.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par l'évaluation de pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines permet de conclure que l'extrait étudié de la plante inhibe la dénaturation de Bovin Sérum Albumine avec des pourcentages d'inhibition de 83.74 ± 9.92 , 75.51 ± 1.71 et 59.81 ± 7.91 respectivement pour les concentrations $(50 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$ et $250 \mu\text{g/ml}$). Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus pour le Diclofenac de sodium, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui exerce un pourcentage d'inhibition de 99.39 ± 2.08 , 96.25 ± 4.73 et 83.46 ± 1.96 respectivement pour les concentrations $50 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$ et $250 \mu\text{g/ml}$.

La présente étude suggère que l'extrait méthanolique de *Globularia alypum* peut inhiber la dénaturation des protéines qui est parmi les causes de l'inflammation.

Mots-clés : Activité anti-inflammatoire, Anti-inflammatoires, *Globularia alypum*, Flavonoïdes, Chromatographie.

Study of the *in vitro* anti-inflammatory activity of the methanolic extract of a medicinal plant "*Globularia alypum*"

Abstract

The aim of this study is to evaluate the anti-inflammatory activity of the methanolic extract (ME) of the aerial part of the medicinal plant *Globularia alypum* by the method of proteins denaturation.

The extract obtained by maceration using a hydroalcoholic mixture (7: 3). The extraction yield is 20.56%. The phytochemical screening on the extract showed that this plant contains flavonoids, tannins, reducing compounds, alkaloids salts, free quinones, reducing sugars, polyphenols and trace of amines.

The quantitative study showed that the plant extract has a significant amount of flavonoids (41.10 ± 5.81 mg EQ / g extract).

The qualitative study by chromatography on Whatman paper No. 1 of the plant extract has shown the presence of variety of the flavonoids compounds which are capable of expressing the desired activity.

The results of the anti-inflammatory activity *in vitro*. By the evaluation of percentage inhibition of proteins denaturation showed the inhibition of the Bovine Serum Albumin denaturation with percentages of 83.74 ± 9.92 , 75.51 ± 1.71 and $59.81 \pm 7.91\%$ respectively for the concentrations (50 μ g / ml, 100 μ g / ml and 250 μ g / ml). The results obtained are comparable to those obtained from sodium diclofenac; an anti-inflammatory drug used as a standard that exert a percentage of inhibition of 99.39 ± 2.08 , 96.25 ± 4.73 and $83.46 \pm 1.96\%$ respectively for the concentrations (50 μ g / ml, 100 μ g / ml and 250 μ g / ml).

The present study suggests that the methanolic extract of *Globularia alypum* can inhibit the denaturation of proteins, which is the cause of inflammation.

Key words: anti-inflammatory activity, Anti-inflammatory, *Globularia alypum*, Flavonoids, Chromatography.

دراسة النشاط المضاد للالتهاب للمستخلص الميثانولي للنبتة الطبية *Globularia alypum*

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم لنشاط المضاد للالتهاب للمستخلص الميثانولي للجزء العلوي للنبتة الطبية *Globularia alypum* باستعمال اختبار تثبيط تشوه البروتينات. تم الحصول على المستخلص عن طريق تنقيع مسحوق النبتة في الخليط المائي الكحولي بنسبة (7:3)، حيث قدر مردود المستخلص بـ 20.56%.

أظهر التقصي الفيتوكيميائي للمستخلص احتواء النبتة على الفلافونويدات وتينينات، المركبات المرجعة، أملاح القلويدات، الكينونات الحرة، السكريات المرجعة، البوليفينولات وآثار الأمينات. وكشفت الدراسة الكمية للمستخلص احتواء النبتة على تركيز من الفلافونويدات قدر بـ (5.81 ± 41.10mg EQ/g E).

أظهرت الدراسة النوعية باستعمال كروماتوغرافيا الورق احتواء مستخلص النبتة على تنوع ملحوظ في المركبات الفلافونويدية القادرة على التعبير عن النشاط المضاد للالتهاب. أظهرت نتائج النشاط المضاد للالتهاب باستعمال اختبار تثبيط تشوه بروتينات المصل البقري بنسبة تثبيط قدرت بـ 83.74 ± 9.92 و 75.51 ± 1.71 و 59.81 ± 7.91% على التوالي مع التراكيز (50µg / مل، 100µg / مل و 250µg / مل) كانت النتائج المحصل عليها مشابهة لتلك المحصل عليها باستخدام الدواء المضاد للالتهاب Diclofenac sodium المستخدم كمركب قياسي حيث اظهر نسبة تثبيط قدرت بـ 99.39 ± 2.08، 96.25 ± 4.73 و 83.46 ± 1.96% على التوالي مع التراكيز (50 µg / مل، 100 µg / مل و 250 µg / مل)

من خلال هذه الدراسة يمكن أن نقترح أن المستخلص الميثانولي للنبتة *Globularia alypum* قادر على تثبيط تشوه البروتينات والذي يعتبر من أسباب الالتهاب.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للالتهاب، مضادات الالتهاب، *Globularia alypum*، الفلافونويدات، الكروماتوغرافيا.

Annexe

Annexe

➤ Procédé de l'extraction des flavonoïdes totaux

Afin d'extraire l'ensemble des flavonoïdes (aglycones et glycosylés), nous avons adopté la méthode de Harborne (1975) selon la quel, l'EMGA est macéré dans l'eau bouillante pendant une nuit, puis filtré par un papier filtre.

L'extraction des flavonoïdes totaux de *Globularia alypum* a été effectuée par le solvant organiques butanolique à partir d'extrait méthanolique.

La deuxième étape consiste en l'affrontement de la phase aqueuse obtenue au n-butanol. Dans une ampoule à décanter, la phase aqueuse obtenue de la filtration est mélangée avec du n-butanol, après agitation puis décantation, deux phases sont obtenues ; une phase organique (butanolique) en haut et une autre aqueuse plus dense en bas. Les deux phases sont séparées et la phase aqueuse subit un deuxième affrontement par le même solvant qu'est le n-butanol pour extraire le maximum de substances flavonoidiques. Enfin, la phase organique totale obtenue est évaporée à sec à 65°C par un évaporateur rotatif. Le résidu d'évaporation représente donc l'extrait des flavonoïdes totaux qui sera utilisé dans l'étude qualitative (CCM).

➤ Préparations tampon phosphate

On dissout 8 g de chlorure de sodium (Na Cl), 0,2 g de chlorure de potassium (K Cl), 1,44 g d'hydrogénophosphate disodique (Na₂HPO₄), 0,24 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) dans 800 ml d'eau distillée. Le pH a été ajusté à 6,3 en utilisant de l'HCl (1 N) et mélange le volume à 100 ml avec l'eau distillée.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Schwartz, Ketty. (2011). Inflammations et maladies : clés de compréhension. Inserm, 74.
- [2] Barton, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 413.
- [3] Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846-852.
- [4] Bouhadjera, (2005). Thèse contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana R.Br.* Et *Aristida pungens L.* Université de Abou Bekr Belkaid.
- [5] Ahmed AA., Abou-El-Ela M., Jakupovic J. (1990). Eudesmanolides and other constituents from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*, 29, 3661-3668.
- [6] Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Goto, K., & Ikeshiro, Y. (1991). Traditional medicine in Turkey I. Folk medicine in northeast Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(2), 191-196.
- [7] Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., & Younos, C. (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *Journal of ethnopharmacology*, 35(2), 123-143.
- [8] Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El Hilaly, J., & Eddouks, M. (2001). Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North center region of Morocco (Fez–Boulemane). *Journal of Ethnopharmacology*, 77(2), 175-182.
- [9] Jaouhari, J. T., Lazrek, H. B., Seddik, A., & Jana, M. (1999). Hypoglycaemic response to *Zygophyllum gaetulum* extracts in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of ethnopharmacology*, 64(3), 211-217.
- [10] Frederich, M. (2014). Les plantes qui nous soignent : de la tradition à la médecine moderne.
- [11] Bosserdet et Rinolter. (1977). Secret et vertus des plantes médicinales. Paris 463p. *Of the Missouri Botanical Garden*, 479-535.
- [12] <http://sante-medecine.journaldesfemmes.com/contents/805-phytotherapie-principes-et-precautions>.
- [13] Chevaltier L, Crouzet-Seganac. (2004). Les médicaments à base des plantes. 2^{ème} édition, 25-30.

- [14] Benkiki, N. (2006). Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*, Doctoral dissertation, Université El Hadj Lakhdar de Batna 1.
- [15] Triki, A. (2002). Effets biologique de polyphénols extraits des plantes médicinales : *Ranunculus repens* L et *Thymus* responsable de certaines pathologie, thèse Magister, Université Mentouri de Constantine.
- [16] Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. En 3^{ème} édition. Lavoisier, éditeur : Techniques et Documentation, Paris. 199–388.
- [17] Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.
- [18] Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K. V., & Bíró, L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, 47(1-4), 119-25.
- [19] 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*, Numéro spécial 2006 : Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, 79-82.
- [20] Bahorun, T. (1998). Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. In *Second Annual Meeting of Agricultural Scientists*, 83.
- [21] Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (Eds.). (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons.
- [22] Queiroz-Monici, K. D. S., Costa, G. E., da Silva, N., Reis, S. M., & de Oliveira, A. C. (2005). Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutrition*, 21(5), 602-608.
- [23] Ali, M. B., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2007). Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules*, 12(3), 607-621.
- [24] Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdely, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.

- [25] 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.
- [26] Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. In *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 51(6), 304-315.
- [27] Guignard J.L. (1996). *Abrégé de biochimie végétale*, Ed. Masson, Paris, 160.
- [28] Cody, V. (1988). Plant flavonoids in biology and medicine II. In *Meeting on Plant Flavonoids in Biology and Medicine (1987: Strasbourg, France)*. Liss.
- [29] Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., & Stöckigt, D. (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A*, 967(1), 85-113.
- [30] Rijke E., Out P., Nissen W. M. A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 11(12), 31 – 63.
- [31] Farid, Chebrouk. Caractérisation analytiques de quelques composés polyphénoliques et terpéniques issus de la plante *Marrubium deserti* de la région de Ghardaïa. Thèse de doctorat. Université Kasdi Merbah de Ouargla.
- [32] Rizzo, A. M., Berselli, P., Zava, S., Montorfano, G., Negroni, M., Corsetto, P., & Berra, B. (2010). Endogenous antioxidants and radical scavengers. In *Bio-Farms for Nutraceuticals*, 69(8), 52-67.
- [33] Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., & Prost, M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines : Bilan et perspectives préventives. *La Presse médicale*, 30(21), 1076-1081.
- [34] Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- [35] Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650.

- [36] Flora, S. J. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(4), 191-206.
- [37] Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91.
- [38] Ito, N., Fukushima, S., & Tsuda, H. (1985). Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 15(2), 109-150.
- [39] Ref'at, A. A., Takruri, H. R., & Al-Sayyed, H. (2010). Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4(3).
- [40] Wichtl, M., & Anton, R. (2003). *Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. 2^{ème} édition. EMInter/Tec & Doc éditions, Paris, 587-589.
- [41] Mourad, B., Mihoub, Z. M., & Sétif, U. F. A. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris L.*
- [42] Tohge, T., Matsui, K., Ohme-Takagi, M., Yamazaki, M., & Saito, K. (2005). Enhanced radical scavenging activity of genetically modified Arabidopsis seeds. *Biotechnology letters*, 27(5), 297-303.
- [43] Ray, S. D., Wong, V., Rinkovsky, A., Bagchi, M., Raje, R. R., & Bagchi, D. (2000). Unique organoprotective properties of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cadmium chloride-induced nephrotoxicity, dimethylnitrosamine (DMN)-induced splenotoxicity and mocap-induced neurotoxicity in mice. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*, 107(1-2), 105-128.
- [44] Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki, F., Ogiwara, T., Satoh, K., Ito, H., ... & Fujisawa, S. I. (2005). Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*, 66(17), 2108-2120.
- [45] Hostettmann K., (1992). *Les plantes sources de médicaments phlébotropes, la lettre de la phlébologie*. Ed. Zyma SA, Nyon. Switzerland, 25.
- [46] Rufini L., Sampaolo G. (1977). Plants of Aromi, Saponi, Cosmétol. *Aerosol*, 59(1), 9-75.
- [47] Hoult, J. R. S., & Paya, M. (1996). Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(4), 713-722.

- [48] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- [49] Chwalek, M. (2004). Hémisynthèse de saponosides à hédéragénine. Etude de l'influence de la chaîne osidique sur l'activité hémolytique, Doctoral dissertation, Reims.
- [50] Delille L. (2007). Les plantes médicinales d'Algérie. Édition BERTI. Alger, (Djemai Zoueglache S, 2008), 122.
- [51] Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., & Stevens, P. (2002). Botanique systématique : une perspective phylogénétique. *De Boeck Supérieur*, 84(87), 396-399.
- [52] Bruneton. (1993). Pharmacognosie, phytochimie Plantes médicinales, technique et Documentation, 2^{ème} édition. Lavoisier. Paris, 266- 275.
- [53] Kirrman J., Cantacuzene P., Duhamel. (1975). Chimie organique fonctions complexes, tome 3, édition. Librairie Colin. Paris, 197- 199.
- [54] Vallet. (1996). Contribution à l'étude de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia Mill*, transformation par *agrobacteriumtumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* et culture de chevelus lacunaires, mémoire D.E.A. Université de Picardie Jules Vienne, 1-32.
- [55] Guignard, J. L. (1994). Abrégé botanique, 9^{ème} édition. Edition Masson, Paris, 204.
- [56] Iserin P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse VUEF, 2^{ème} édition. Paris, 14-275.
- [57] Wichtl, M., & Anton, R. (2003). Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2^{ème} édition. EMInter/Tec & Doc éditions, Paris, 587-589.
- [58] Hopkins, W. G. (2003). Physiologie végétale, 2^{ème} édition. De Boeck, Bruscelles, 61-476.
- [59] Khlifi, 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.
- [60] <https://www.visoflora.com/photos-nature/photo-globularia-alypum-6.html>.
- [61] <http://flore-mediterraneenne.com/globulaire-buissonnante-ou-turbith/1637>.
- [62] <http://www.jardin-ecologique.fr/jardin-sec-bleu/693-globularia-alypum.html>.
- [63] Endress, P. K. (1996). Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press.

- [64] Polunin, O., Huxley, A., & Aymonin, G. G. (1967). Fleurs du bassin méditerranéen. Fernand Nathan.
- [65] Bouriche, H., Kada, S., Assaf, A. M., Senator, A., Gül, F., & Dimertas, I. (2016). Phytochemical screening and anti-inflammatory properties of Algerian *Hertia cheirifolia* methanol extract. *Pharmaceutical biology*, 54(11), 2584-2590.
- [66] 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.
- [67] Sanchez J. V., (1933). *Anales soc. Espan. Fis quim*, 31, 361-368.
- [68] Bernard P., Lallemand M. M., G. Blansard. (1974). *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 8(3), 174-925.
- [69] Chaudhuri R. K., O. Sticher, T. Winkler, (1979). *Helvetica Chemica Acta*, (34), 314-952.
- [70] Chaudhuri, R. K., & Sticher, O. (1981). New Iridoid Glucosides and a Lignan Diglucoside from *Globularia alypum* L. *Helvetica Chimica Acta*, 64(1), 3-15.
- [71] Ben Hassine, B., Bui, A. M., & Mighri, M. (1982). Contribution à l'étude des plantes médicinales tunisiennes. Identification des acides Phénols de *Globularia alypum* L. par CCM bidimensionnelle et HPLC. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 7, 3-10.
- [72] Ben hassine B., A. Bui, Z. Mighri, A. Cave. (1982). *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 16(3), 197-205.
- [73] Louis S., Darghouth-Kesraoui F., Baghdikian B., Elias R., Boukef K., Blansard G. (1999) *Pharmacie*, 54(4), 309-310.
- [74] Boutiti, A., Benguerba, A., Kitouni, R., Bouhroum, M., Benayache, S., & Benayache, F. (2008). Secondary metabolites from *Globularia alypum*. *Chemistry of natural compound*, 44(4), 543-544.
- [75] Taghzouti A. OK., Balouirib M., Ouedrhiric W., Ech chahadd A., Romanea A. (2016). *In vitro* evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of *Globularia alypum* L. extracts. *J. Mater. Environ. Sci*, 7(6), 1988-1995.
- [76] Khlifia, D., Sghaierc, R. M., Laounic, D., Hayounid, A. A., Hamdib, M., & Bouajilaa, J. (2013). Anti-Inflammatory and Acetylcholinesterase inhibition activities of *Globularia Alypum*. *Journal of Medical and Bioengineering*, 2(4).

- [77] Touaibia M., Chaouch F. Z. (2016). « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 14/ Janvier, 02-06.
- [78] Weill B., Batteux F., Dhainaut J. (2003). Immun pathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.
- [79] Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
- [80] López, S., Bastida, J., Viladomat, F., & Codina, C. (2002). Acetylcholinesterase inhibitory activity of some *Amaryllidaceae* alkaloids and Narcissus extracts. *Life Sciences*, 71(21), 2521-2529.
- [81] Rousselet M., Vignaud J., Hofman P. et Chatelet F. (2005). Inflammation et pathologie inflammatoire, Mai.
- [82] Naveau, B. (2005). Le blocage simultané des cyclo-oxygénases et de la 5-lipoxygénase : une nouvelle voie pour traiter l'inflammation?. *Revue du rhumatisme*, 72(5), 379-382.
- [83] Vane, J. R., Änggård, E. E., & Botting, R. M. (1990). Regulatory functions of the vascular endothelium. *New England Journal of Medicine*, 323(1), 27-36.
- [84] Kumar Vinay, Abul K Abbas, Nelson Fausto and Richard Mitchell. (2007). *Robbins Basic Pathology*, eighth Edition, 20-60.
- [85] Schoroderet M. (1992). *Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*. Eds, Office des publications universitaires (Alger), 2, 523-53.
- [86] Fauve, R., & Hevin, M. B. (1998). Réaction inflammatoire et réactions immunitaires. *L'inflammation* (JL Eurotext, éd.), 10-20.
- [87] Serhan, C. N., Ward, P. A., & Gilroy, D. W. (Eds.). (2010). *Fundamentals of inflammation*. Cambridge University Press.
- [89] Rankin, J. A. (2004). Biological mediators of acute inflammation. *AACN Advanced Critical Care*, 15(1), 3-17.
- [90] Rather, L. J. (1971). Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 47(3), 303.
- [91] Kumar, C. (1998). *Collins. Robbins Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: WB Saunders Company.

- [92] Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1993). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free radical research communications*, 19(3), 141-158.
- [93] Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867.
- [94] Gunn, L., Ding, C., Liu, M., Ma, Y., Qi, C., Cai, Y., ... & Yan, J. (2012). Opposing roles for complement component C5a in tumor progression and the tumor microenvironment. *The Journal of Immunology*, 189(6), 2985-2994.
- [95] Copland, J. A., Sheffield-Moore, M., Koldzic-Zivanovic, N., Gentry, S., Lamprou, G., Tzortzatou-Stathopoulou, F., ... & Vlahopoulos, S. A. (2009). Sex steroid receptors in skeletal differentiation and epithelial neoplasia: is tissue-specific intervention possible?. *Bioessays*, 31(6), 629-641.
- [96] Stora D. (2005). Chapitre : généralités sur les anti-inflammatoires. *Pharmacologies B.P. print book français 3^{ème} édition*, 101-102.
- [97] Ayoub, F. E. R. R. A. D. J. I. (2011). Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies *Pistacia lentiscus*, *Doctoral dissertation*, Université Ferhat Abbas de Sétif 1.
- [98] Blain, H., Jouzeau, J. Y., Netter, P., & Jeandel, C. (2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *La revue de médecine interne*, 21(11), 978-988.
- [99] Barnes, P. J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical science*, 94(6), 557-572.
- [100] http://el-milia.over-blog.com/pages/Presentation_de_ElMilia_en_arabe_-1220039.html.
- [101] Markham, K. R. (1982). *Techniques of flavonoid identification (Vol. 31)*. London: Academic press.
- [102] Karumi, Y., Onyeyili, P. A., & Ogugbuaja, V. O. (2004). Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci*, 4(3), 179-182.
- [103] Edeoga, H. O., Okwu, D. E., & Mbaebie, B. O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, 4(7), 685-688.

- [104] Benmehdi, H. (2000). Valorisation des plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte, Doctoral dissertation, Thèse de Magister. Chimie organique appliquée. Université de Tlemcen.
- [105] Benmehdi, A. (2001). Identification des principes actifs des extraits des plantes médicinales. *Phytochimie*, 6, 11-27.
- [106] Oloyede, O. I. (2005). Chemical profile of unripe pulp of *Carica papaya*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(6), 379-381.
- [107] Park Yk., matias de Alencar S., Zima de Azenar C., Scamparini RP., Ganzalez M., Maria AA. (2001). Comparação Das características físicoquímicas das propolis produzidas na região subtropical da América do Sul : Evidência fitoquímica de sua origem botânica, *Mensagem Doce*, 61.
- [108] Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., ... & Pinkas, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11), 1086-1089.
- [109] Vanhaelen, M., & Vanhaelen-Fastré, R. (1980). High-performance liquid, gas-liquid and thin-layer chromatography of naturally occurring flavonoids, phenolic and related compounds. *Journal of Chromatography A*, 187(1), 255-260.
- [110] Habibur Rahman, M. Chinna Eswaraiah et A.M. Dutta. (2015). *In-vitro* Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of *Oryza sativa* Var. *Joha Rice* (An Aromatic Indigenous Rice of Assam) *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 15 (1), 115-121.
- [111] Yrjönen, T. (2004). Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products, 64.
- [112] Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25), 7292-7295.
- [113] Fellah, S., Romdhane, M., & Abderraba, M. (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. La cueille dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal-Société Algérienne De Chimie*, 16(2), 193.
- [114] Ribéreau-Gayon, P. (1968). *Les Composés phénoliques des végétaux* : par Pascal Ribéreau-Gayon, ... Dunod.

- [115] Harborn JB. (1984). Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis. 2^{ème} edition .Chapman and Hall eds, 37-85.
- [116] Wagner, H., Bladt, S., & Zgainski, E. M. (1984). Flavonoid drugs. In Plant Drug Analysis. Springer Berlin Heidelberg, 163-193.
- [117] Harborne, J. B. (1975). Flavonoid sulphates: a new class of sulphur compounds in higher plants. *Phytochemistry*, 14(5-6), 1147-1155.
- [118] Mizushima, Y., & Kobayashi, M. (1968). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(3), 169-173.
- [119] Sangeetha, M., Kousalya, K., Lavanya, R., Sowmya, C., Chamundeeswari, D., & Reddy, C. U. M. (2011). *In-vitro* anti-inflammatory and anti-arthritic activity of leaves of *Cleodendron inerme*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and chemical sciences*, 2(1), 822-827.
- [120] Verma, M., Adarsh, K. P., Ajay, K. D., & Anugrag, K. B. (2011). Anti-Denaturation and Antioxidant Activities of *Annona cherimola* *In vitro*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(2).
- [121] Jayaprakasam, R., & Ravi, T. K. (2013). Evaluation of anti-arthritic activity of the root extract of *Acalypha indica* Linn. Using *in vitro* techniques. *International journal of phytopharmacy*, 2(6), 169-173.
- [122] Gambhine M, Juvekar A, Wankhede S. (2009). Evaluation of anti-inflammatory activity of methanol extract of *Barleria eristata* leaves by *in vitro* and *in vivo* methods. *The internet journal of pharmacology*, 7(1), 1-4.
- [123] Kar, B., Kumar, R. S., Karmakar, I., Dola, N., Bala, A., Mazumder, U. K., & Hadar, P. K. (2012). Antioxidant and *in vitro* anti-inflammatory activities of *Mimusops elengi* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S976-S980.

<p>Nom et prénom :</p> <p>Moussaoui Manel</p>	<p>Date de soutenance :</p> <p>21/06/2017</p>
<p align="center">Master Académique en : Biochimie Appliquée</p>	
<p align="center">Titre</p> <p align="center">Etude de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> de l'extrait méthanolique d'une plante médicinale « <i>Globularia alypum</i> »</p>	
<p align="center">Résumé</p> <p>L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique (EM) de la partie aérienne de la plante médicinale <i>Globularia alypum</i> par la méthode de la dénaturation des protéines.</p> <p>L'extrait a été obtenu par macération en utilisant un mélange hydroalcoolique (7:3). Le rendement de l'extraction est de 20.56%. Le screening phytochimique sur l'extrait a montré que cette plante contient : des flavonoïdes, des tanins, des composés réducteurs, des alcaloïdes sels, des quinones libres, des sucres réducteurs, des polyphénols et des traces des amines.</p> <p>L'étude quantitative a révélé la richesse de cette plante en flavonoïdes avec un teneur de (41,10 ± 5,81 mg/g extrait).</p> <p>L'étude qualitative par chromatographie sur papier Whatman n°1 de l'extrait de la plante a montré une diversité remarquable des composés flavoniques susceptibles d'exprimer l'activité recherchée.</p> <p>Les résultats de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> par l'évaluation de pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines permet de conclure que l'extrait étudié de la plante inhibe la dénaturation de Bovin Sérum Albumine avec des pourcentages d'inhibition de 83.74±9.92, 75.51±1.71 et 59.81±7.91 respectivement pour les concentrations (50µg/ml, 100µg/ml et 250 µg/ml). Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus pour le Diclofénac de sodium, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui exerce un pourcentage d'inhibition de 99.39±2.08, 96.25±4.73 et 83.46±1.96 respectivement pour les concentrations 50µg/ml, 100µg/ml et 250 µg/ml.</p> <p>La présente étude suggère que l'extrait méthanolique de <i>Globularia alypum</i> peut inhiber la dénaturation des protéines qui est parmi les causes de l'inflammation.</p> <p>Mots-clés : Activité anti-inflammatoire, Anti-inflammatoires, <i>Globularia alypum</i>, Flavonoïdes, Chromatographie.</p>	

