

Dosage des poly phénols et étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des différents extraits des feuilles du *Globularia alypum L.*

Khantouche Linda¹, Abderabba Manef²

(^{1,2} Institut préparatoire aux études scientifiques et techniques, la Marsa, Tunisie)

Corresponding Author: Khantouche Linda

Résumé: Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de l'extrait éthanolique, méthanolique et aqueux des feuilles du *Globularia alypum (G.a)* de la région de Zaghouan en tant qu'antioxydant et antibactérien. Les méthodes appliquées pour mesurer l'activité antioxydante sont la DPPH et la β -carotène, tandis que pour l'activité antimicrobienne est la méthode de diffusion en milieu solide.

Les résultats ont révélé que les différents extraits des feuilles de *G.a* sont dotés d'une teneur assez élevée en polyphénols (qui varient entre 180,5 et 144 mg EAG/g ms), en flavonoïdes (entre 20,7 et 12,3 mg CE/g ms) et en anthocyanines (entre 10,5 et 6,5 mg E Cy/g ms).

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de β -carotène révèle que tous les extraits des feuilles de *G.a* présentent une capacité antioxydante plus importante que celle du BHT. Le test DPPH montre que l'activité antiradicalaire des extraits est élevé et au voisinage de celle de BHT.

En plus, ces extraits présentent un effet antimicrobien qui diffère d'un extrait à un autre.

Mots clés - activité antimicrobienne, activité antioxydante, *Globularia alypum L.*, polyphénols,

Date of Submission: 05-01-2018

Date of acceptance: 18-01-2018

I. Introduction

La globulaire est sous arbrisseau rencontré surtout dans les endroits secs : elle est très souvent associée au ciste et au romarin. Cette plante vivace pousse dans les lieux rocailleux et broussailleux secs, de préférence sur du calcaire. Fréquemment, ces buissons poussent sur de gros rochers isolés ou sur des falaises. Arbuste rameux d'environ 60 cm de hauteur. Feuilles persistantes, coriaces, ovales, lancéolées, élargies à l'extrémité et atténuées à la base : elles sont dites spatulées. Les fleurs réunies en capitules denses à bractées ciliées, atteignant près de 2 cm de diamètre et disposées le long et au sommet des tiges, elles sont d'un bleu clair réunies en capitule globuleux solitaire et situé à l'extrémité des rameaux [1].

Les feuilles de *G.alypum L* sont hypoglycémique : elles augmentent la production du taux de l'insuline, laxative [2, 3, 4], cholagogue, stomacal, purgatif, sudorifique [5].

L'étude de l'activité antioxydante des feuilles de *Globularia alypum* est très importante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant [6].

Plusieurs travaux ont été réalisés sur le genre *Globularia* dont les auteurs avancent la présence des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des anthocyanine [7]. Les études menées sur l'espèce *Globularia alypum* rapportent que les extraits méthanoliques de cette plante a une activité antioxydante [8,9].

II. Matériel Et Methodes

II.1. Préparation du matériel végétal

L'espèce *Globularia alypum L* a été identifiée par le Professeur Boussaid Mohamed INSAT (Tunisie) et a été récoltée en avril 2016 dans la région de Zaghouan (Tunisie). Les feuilles de la plante sont ensuite séchées dans un endroit bien aéré et à l'abri de la lumière, broyées et conservées dans des flacons en verre à l'obscurité.



Fig.1. *Globularia alypum L*

Fig.2. feuilles et fleurs de *G.a*

Fig.3.poudre des feuilles de *G.a*

II.2. Préparation des extraits

II.2.1. Extraction par macération

1g de la poudre des feuilles est macérée dans 20 ml de solvant (éthanol, méthanol et eau) à l'abri de la lumière et sous agitation pendant 3 jours. Chaque solution, est par la suite évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif (à une T° : 45°C pour l'extrait éthanolique et méthanolique et 90°C pour l'extrait aqueux). Chacun des ces extraits est placé dans le réfrigérateur à 10°C.

II.3. Dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des polyphénols est réalisé par spectrophotométrie avec le réactif de Folin Ciocalteu qui, en milieu alcalin, est réduit en oxyde de tungstène et de molybdène donnant une couleur bleue en présence de polyphénols.

Le mélange est constitué d'une prise de 100 µl de l'extrait, de 1 ml d'eau distillée et de 500 µl du réactif Folin Ciocalteu. Après 1 min de repos, 1,5 ml de NaCO₃ (20%) est ajouté. Après une incubation de 2 heures à l'obscurité à température ambiante, la lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 760 nm. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique, en suivant les mêmes étapes du dosage [10].

II.4. Dosage des flavonoïdes

La détermination des flavonoïdes totaux est réalisée par spectrophotométrie selon la méthode directe de Zeghad et Merghem [11]. Une prise de 50 µl d'extrait et de 75 µl d'eau distillée est mélangée avec 35,5 µl de NaNO₂ (5%) et de 75 µl d'AlCl₃-6H₂O (10%) qui doivent être fraîchement préparée. Le mélange est soumis au repos pendant 5 min, puis on additionne au mélange 1,2 µl d'eau distillée. La lecture de l'absorbance est faite à 510 nm.

II.5. Dosage des anthocyanines totales

Le dosage des anthocyanines totales est réalisé par spectrophotométrie selon Pamino-Duran et al,2001 [12]. Un aliquote de l'extrait est dilué (10 fois) dans une solution éthanolique de HCl (0,25 M). La solution est vigoureusement mélangée et son absorbance (520 nm) est mesurée après 5 min en utilisant la solution de dilution comme blanc. La teneur en anthocyanines est déterminée comme équivalent de cyanine (cyanidine 3-O-glucoside)/ g de matière végétale.

II.6. Dosage de l'activité anti-radicalaire (test DPPH)

Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical obtenu sans aucune préparation préalable. Il est piégé par les composés antioxydants via un processus de transfert d'hydrogène générant le composé réduit DPPH-H et comme étant chromogène de nature, la solution vire du rose au jaune. Cette transformation est proportionnelle à la concentration et à l'efficacité de l'antioxydant qui est facilement quantifiable par mesure de l'absorbance à 517 nm. Cette technique est basée sur l'utilisation des radicaux très stables de DPPH et très utile et efficace pour titrer le groupement oxydables des composés naturels ou synthétiques utilisées comme antioxydants.

Un aliquote de 1 ml d'extrait à étudier à différent concentration (1, 10, 100 et 1000 µl/ml) est additionnée à 250 µl d'une solution métabolique de DPPH (0,2mM).

Après une agitation vigoureuse du mélange, il est conservé au repos pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'une spectrophotométrie UV/visible en se référant à un témoin

sans extrait, le méthanol est utilisé pour mettre le spectrophotomètre à zéro et on mesure l'absorbance du radical DPPH sans extrait comme contrôle positif [13].

L'activité anti radicalaire de chaque échantillon est exprimée en pourcentage d'inhibition du DPPH en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition DPPH} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

II.7. Dosage de l'activité antioxydante totale (méthode de la β -carotène)

Le dosage de l'activité antioxydante est déterminé selon la méthode de Pratt(1980).

Cette technique est basée sur le pouvoir d'un composé ou d'un mélange complexe à prévenir la décoloration (l'oxydation) d'une solution de β -carotène dans un système d'émulsion à base d'acide linoléique.

Le mélange renferme 0,5 μg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme, 25 μl d'acide linoléique et 200 mg de tween 40. Après, on passe à évaporer complètement le chloroforme à 50°C que l'on ajoute 100 ml d'eau distillée saturée en O₂. Après une vigoureuse agitation, une prise de 2500 μl de mélange est mise dans des tubes à essai, puis un ajout de 350 μl de l'échantillon préparé. Le BHT (Butylated Hydroxytoluene) est utilisé comme contrôle positif.

Les lectures de l'absorbance (490 nm) sont faites à chaque intervalle de temps de 20 min jusqu'à l'échantillon de contrôle change de couleur et celle de la β -carotène disparaît [14].

II.8. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé cité par Treki et al., 2009 ; Meddour.A et al., 2013 [15, 16].

Cinq souches de référence ; provenant de l'institut pasteur, Tunisie ; Staphylococcus aureus ATCC 25923, Bacillus subtilis 166, E.coli G.M 109, Pseudomonas aeruginosae et Salmonella enteridis ATCC 502.

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui ont servi par la suite à préparer l'inoculum en les trempant dans des tubes de solution d'eau distillée stérile afin d'avoir une densité cellulaire initiale.

Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, on a trempé un écouvillon dans la suspension et on a étalé la surface entière avec la gélose Mueller Hinton à trois reprises. Après chaque application, on a tourné la boîte de 60° environ en vue d'assurer une distribution homogène de l'inoculum. Enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose.

Des disques de papier Wathman stériles (6 mm de diamètre) sont imprégnés de concentrations croissantes d'extraits secs repris avec le diméthyle sulfoxyde (DMSO) et appliqués, à l'aide d'une pince, sur la surface du milieu GMH. Chaque extrait est testé (1 disque/plaque), avec les antibiotiques le Chloramphenicol (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) et le Streptomycine (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 18 heures à 37 °C.

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition.

Analyse statistique

L'étude statistique a été réalisée par le logiciel EXCEL. Les résultats sont répétés un triple de fois et sont exprimés en moyenne \pm SD. Les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées significatives.

III. Resultats Et Discussion

III.1. La teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et en anthocyanines

Le tableau.1. Montre que le contenu en poly phénols totaux, flavonoïdes et anthocyanines varient respectivement entre 180,5 \pm 2,1 à 144,1 \pm 1,2 mg GAE/g matière sèche ; 20,7 \pm 0,7 et 12,3 \pm 0,3 mg CE/g matière sèche ; 10,5 \pm 0,8 à 6,5 \pm 0,3 mg ECy/g matière sèche). La quantité maximale en polyphénols, flavonoïdes et en anthocyanines est détectée dans l'extrait éthanolique. En effet, la teneur en polyphénols, flavonoïdes et anthocyanines dans l'extrait éthanolique est hautement significatives ($p < 0,05$) par rapport aux autres extraits. Cette variation est due à la différence de polarité des solvants d'extraction.

Tab.1. la teneur en polyphénols, en flavonoïdes et en anthocyanines dans les différents extraits,

Extraits	Polyphénols totaux (mg EAG/ g ms)	Flavonoïdes (mg CE/ g ms)	Anthocyanines (mg ECy/g ms)
Ethanolique	180,5 \pm 2,1	20,7 \pm 0,7	10,5 \pm 0,8
Méthanolique	150,2 \pm 1,5	16,2 \pm 0,5	8,9 \pm 0,7
Aqueux	144,1 \pm 1,2	12,3 \pm 0,3	6,5 \pm 0,3

Nos résultats montrent que le contenu en polyphénols et en flavonoïdes sont hautement élevés que les résultats publiés par Djeridane et al., 2006 [17] (21,54 mg GAE/ g matières sèche et 4,54 mg/ g QE matière sèche, respectivement). Cette différence de valeur peut être expliquée par la variation des conditions climatiques et celle de la composition du sol entre la Tunisie et l'Algérie. De même, la teneur en polyphénols totaux mentionnée dans le tableau .1. sont plus élevées que celles de Kara A et al., 2016 (103,81 mg GAE/g ms dans l'extrait butanolique des feuilles de G.a. En plus, Othmane Khalifi T et al., 2016 [18] ont révélé que les extraits méthanoliques et éthyl acétatique des feuilles de G.a présentent une teneur inférieure en polyphénols totaux que nos résultats (67,55 et 50,99 mg GAE/g ms ; respectivement)

En outre, les résultats d' El Akrem ., 2009 [19] sont en parfait accord avec nos résultats (le contenu en polyphénols totaux est de 153,9 mg GAE/g ms, le contenu en flavonoïdes est 26,6 mg/g QE ms et celui en anthocyanines est de 8,5 mg ECy/ g ms).

Cependant, les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes de Khlifi D et al., 2011 [20] sont supérieures que les miennes (247,24 mg GAE/g ms ; 19,29 mg CE/ g ms pour l'extrait méthanolique des feuilles de G.a.) en outre, la teneur en anthocyanine affichée dans le tableau .1. sont largement supérieure que celles de Khlifi D et al., 2011 (0,070 et 0,02849 mg ECy/g ms dans l'extrait acétonique et aqueux, respectivement).

III.2. Evaluation de l'activité antioxydante

III.2.1. La méthode de la β -carotène

Cette méthode est basée sur la perte de couleur jaune de β -carotène qui est due à sa réaction avec les radicaux libres. Ces derniers sont formés suite à l'oxydation par l'acide linoléique dans une émulsion. Le degré de blanchissement de β -carotène peut se ralentir en présence des antioxydants [14]. Cette méthode est utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydante de quelques échantillons en comparaison avec le BHT. Comme il a illustré dans la figure.1. Nous signalons une baisse de l'absorbance au cours du temps. Cette diminution est beaucoup plus accentuée pour les extraits étudiés comparativement au témoin positif. Ce dernier garde une DO presque stable au cours du temps (au à l'entour de 0,003 nm jusqu'à 40 min).

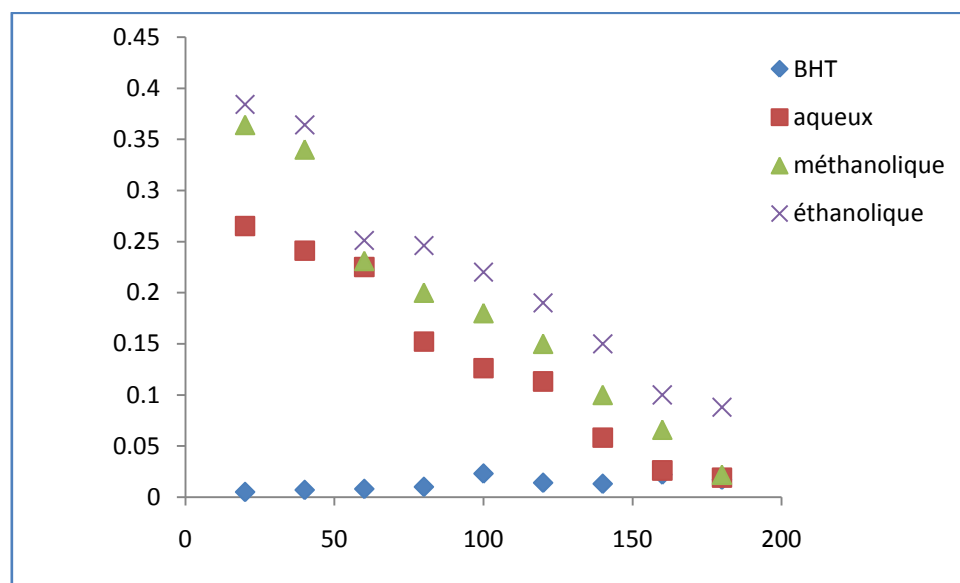


Fig.4. L'évolution de l'activité antioxydante des différents extraits et du BHT par la méthode de β -carotène

III.2.2. La méthode de DPPH

Le DPPH est un radical libre de couleur violette, est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés anti-radicalaires. Nos résultats sont exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti radicalaire (tab.2.) et révèlent que tous les extraits ont un pouvoir antioxydant. Concernant la solution initiale (non diluée), l'activité anti radicalaire diminue selon le type de l'extrait. Elle est plus intéressante dans l'extrait hexane que celui de l'eau, du méthanol et du DCM (74,73%, 76,71%, 65,96% et 62,34%, respectivement). En effet, l'activité anti radicalaire de deux extraits alcooliques sont proches à celle du BHT (76,71%). Les résultats ont montré que plus le facteur de dilution est élevé plus le pourcentage de l'activité anti radicalaire diminue. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Khlifi S et al., 2005 [21].

Tab.2. le pourcentage de l'activité anti radicalaire de la solution initiale, diluées et de celui du BHT.

Extraits	C° initiale (2mg/ml)	C° diluée (1/10)	C° diluée (1/100)	C° diluée (1/1000)
éthanolique	75,73±1,02	68,62±1,04	50,08±0,83	45,23±1,05
Méthanolique	75,46±2,05	74,047±1,22	70,81±1,25	49,63±0,36
aqueux	67,66±1,60	65,62±1,21	63,35±1,65	50,65±0,23
BHT	76,71±1,65	76,42±1,35	76,25±1,65	75,87±1,56

Nos résultats coïncident avec les résultats d'Othman Khalifi Taghzouti., 2016 [18] qui révèlent que l'extrait méthanolique des feuilles présente un effet antioxydant très élevé au delà de 51% (DPPH). Ce pouvoir antioxydant dépasse celui de BHT (6,6%).

Les extraits de G.a sont utilisés comme source des antioxydants potentiels. Cependant, plusieurs extraits de G. sont des sources significatives d'antioxydants, présente une activité antigenotoxique, antituberculeuses [19, 20, 22].

Les résultats de Othman Khalifi T et al., 2016 [18] coïncident avec les miennes, en effet, l'activité antioxydante mesurée par la méthode de DPPH dépasse celle du BHT. De même, Khelifi S et al., 2005 [21], ont révélé que l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne de G.alypum présente une activité antioxydante très importante au voisinage de celle du BHT (% d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique est de 24% à 64% pour des concentrations de 10 à 100µg/ml comparé à celui du BHT qui est de l'ordre de 76% pour une concentration de 50µg/ml).

En outre, les résultats de Ben Mansour R., 2012 [23], révèlent que les feuilles de G.alypum contiennent les molécules les plus antioxydante que toute autre organe de la plante. En plus, l'extrait hydroéthanolique des feuilles de G. alypum montre une importante activité antioxydante qui dépasse celle du BHT. Cette activité antiradicalaire qui dépasse celle du contrôle positif le BHT peut être expliqué par une teneur très élevée en polyphénols, en flavonoïdes et en anthocyanines aussi bien dans l'extrait éthanolique que dans l'extrait hydroéthanolique. En effet, Es Safi et al [24, 25] et Khelifi et al., 2005 [21] ont isolé des nouvelles molécules phénoliques (6-hydroxyluteolin, 7-O-laminaribioside, eriodictyol 7-O-sophoroside et 6'-O-coumaroyl-1'-O-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]-β-D-glucopyranoside) de la partie aérienne de la plante. Ces molécules ont une importante activité antioxydante mesurée par la méthode DPPH. En effet, les polyphénols sont reconnus pour leurs multiples propriétés biologiques anti-inflammatoires, anticancéreuses, antioxydante. Ce sont des antioxydants naturels puissants impliqués dans la défense contre les dommages oxydatifs au niveau de la cellule car ils possèdent des structures chimiques idéales. En effet selon Ozsoy et al., 2008 [26] l'activité antioxydante des polyphénols est plus puissante que les tocophérols et l'acide ascorbique.

III.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits alcooliques et de l'extrait aqueux sont situées dans le tableau.3.

Tab.3. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des feuilles de G.a et des antibiotiques (Chloramphenicol et Streptomycine).

Microorganismes/ extraits	aqueux (100mg/ml)	éthanolique (100mg/ml)	Méthanolique (100mg/ml)	Chloramphenicol (30µg/µl)		Streptomycine (10µg/µl)	
	DD	DD	DD	DD	MIC	DD	MIC
E.coli GM 109	-	-	-	15,00	23,00	27,00	1,5
Pseudomonas aeruginosa	-	9,64±0,33	10,78±0,11	17,00	20,00	28,00	1,5
Salmonella enteridis ATCC 502	-	-	-	13,00	20,00	27,00	1,5
Staphylococcus aureus ATCC 25923	17,23±0,66	23,96±0,36	24,67±0,63	15,00	20,00	33,00	2,00
Bacillus subtilis 166	-	19,23±0,24	15,45±0,25	22,00	5,00	20,00	1,00

La méthode de disque de diffusion est recommandée selon NCCLS. Le diamètre de la zone d'inhibition (mm) incluant le disque de diamètre de 6 mm.

Concentration : les valeurs sont en mg/ml (les extraits) et en µg/µl (Antibiotiques)

- absence d'activité antimicrobienne

L'extrait alcoolique (éthanolique et méthanolique) présente une activité antimicrobienne plus importante que celui aqueux. En effet, les microorganismes les plus sensibles à ces extraits sont Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus et Bacillus subtilis (9,64 ; 23,96 ; 19,23 et 10,78 ; 24,67 ; 15,45 mm respectivement pour les zones d'inhibition des extraits éthanoliques et méthanoliques). Ceci est en accord avec

les investigations de plusieurs auteurs [9, 27, 28]. qui ont montré une activité anti-Staphylococcus aureus (ZI= 18mm pour l'extrait aqueux, 6,67mm et 7,00mm pour l'extrait méthanolique et acétate éthylique et 6,67mm pour l'extrait méthanolique, respectivement).

De même, Taghzouti o.K et al., 2016 [28] et Zohra Ghlissi et al., 2016 [9] ont révélé une activité anti-Bacillus subtilis. Cependant et à la différence de nos résultats, les extraits de Taghzouti o.K et al., 2016 [28] et Zohra Ghlissi et al., 2016 [9] ne présentent aucune inhibition Pseudomonas aeruginosa, ceci peut être expliquer à la différence remarquable de concentration des extraits.

Ce travail ne présente aucune activité anti-E.coli, ceci est en accord avec les résultats de Boussoulim Naouel., 2014 [27], Taghzouti.O.K et al., 2016 [28] et Zohra Ghlissi et al., 2016 [9].

Cependant, l'extrait aqueux ne présente qu'une unique activité anti-Staphylococcus aureus (ZI =17,23 mm). L'action antimicrobienne des extraits alcooliques peut être expliquée par sa richesse en phénols.

D'autre part, ces extraits ne présentent aucune action d'inhibition sur E.coli et Salmonella enteridis.

IV. Conclusion

L'étude phytochimique des extraits des feuilles de Globularia alypum montre la présence des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des anthocyanines. L'activité antioxydante par le test de DPPH a révélé que les extraits de *Globularia alypum L* présentent des activités anti radicalaires très importantes, toutefois, l'activité des extraits alcooliques est proche à celle du BHT. La méthode de β -carotène a montré que cette plante possède une activité antioxydante supérieure à celle du BHT. En ce qui concerne l'activité antibactérienne, E. coli et S. enteridis ne sont pas sensibles à aucun extrait. Cependant, les extraits alcooliques possèdent une activité anti-P. aeruginosa, S. aureus et B.subtilis, d'autre part l'extrait aqueux présente une unique activité anti S. aureus.

V. Remerciements

il est agréable d' adresser nos vifs remerciements à l' ISET de Zaghuan, à l'Institut Pasteur et à toute personne qui a contribué à l' élaboration de ce travail.

References Bibliographiques

- [1]. Quezel et Santa ..Nouvelles Flore de l'Algérie et des regions désertiques méridionales, centre National de la recherche scientifique (Ed) 15, quasi Anatole-France- Paris 7e 1962), 636.
- [2]. Jouad, H. Maghrani, M., Eddouks, M. Hypoglycaemic effect of Rubus fruticosus L.and Globularia alypum L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 81 (2), 2002, 351-356.
- [3]. Skim, F. Kaaya, A. Jaouhari, T.J. Lazrek, HB. Jana ,M. El Amri, H. Hypoglycaemic activity of Globularia alypum leaves in rats. *Fitoterapia*.70, 1999, 382-389.
- [4]. Bellakhdar, J. Claisse, R. Fleurentin ,J. Younos C. Repertory of Standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *J.Ethnopharmacol* , 35 (2) 1991, 123-43.
- [5]. Sijelmassi , A. 1993. Les plantes médicinales du Maroc, Le Fenfec (3ème Edition) (Casablanca, 1993) 285.
- [6]. Meddour, A. Yahia, M. Benkiki ,N and Ayachi, A. Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du Capparis spinosa, *L.Science Journal*, 14, 2013, 49-60.
- [7]. Chograni, H., Riahi ,L. Zaouali, Y and Boussaid , M. polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian Globularia alypum L. (Globulariaceae). *African Journal of Ecology* 51, 2013, 343-347.
- [8]. Es-Safi ,N.E. Khelifi ,S. Kerhoas, L. Kollmann, A. El Abbouyi ,A and Ducrot PH. (2005) Antioxidant Constituents of the aerial parts of Globularia alypum growing in Morocco. *J.Nat Prod* , 68 (8) 2005,1293-1296.
- [9]. Ghlissi, Z. Kallel, R. Silia, A. Harrabi, B. Atheymen, R. Zeghal, K. Bougateg, A. Sahnoun, Z. Globularia alypum methanolic extract improves burn wound healing process and inflammation in rats and possesses antibacterial and antioxidant activities. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 84 ,2016, 1488-1495.
- [10]. Hayouni ,E. Abedrabba ,M. Bouix, M. Hamdi , M . The effect of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts. *Food Chemistry* 105, 2007, 1126-1134.
- [11]. Zeghad, N and Merghem , R. Antioxidant and Antibacterial activities of Thymus vulgaris L. *ROM.j.BIOL.-PLANT boil*. 58, 2013, 27-36.
- [12]. Pamino-Duran, E.A.. Giusti, M.M. Wrolstad, R.E. Gloria, M.B.A.. Anthocyanins from Oxalis triangularis as potential food colorants. *Food Chem* 75, 2001, 211-216.
- [13]. Guesmi, F. Ben farhat ,M. Mejri, M and Landoulsi, A. In vitro assessment of antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of Thymus hirtus sp. algeriensis. *Lipids in Health and Disease* 13, 2014, 114.
- [14]. Pratt, D.E. (1980) Natural antioxidants of soybean and other oil-seeds. In M.G.Simic and M.Karel (Eds.), Autoxidation in food and biological system. New York: Plenum Press: 283-292.
- [15]. Treki A,S. Merghem, R. Dehimat, L. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une Labiée :Thymus hirtus. *Sciences et Technologie* 29, 2009, 25-29.
- [16]. Meddour, A. Yahia, M. Benkiki, N and Ayachi , A. (2013) Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du Capparis spinosa L.Science Journal , 14, 2013, 49-60.
- [17]. Djeridane ,Yousfi, M. Nadjemi , B. Boutassouna , D, Stocker, P,Vidal , N . Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolics compounds. *Food chemistry*, 97, 2006, 654-660.

- [18]. Khalifi Taghzouti, O. Balouiri, M. Ouedrhiri, W. Ech chahad, A. Romane, A. In vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of Globularia alypum L. extracts. *J. Mater. Environ. Sci* 7 (6), 2016, 1988-1995.
- [19]. Hayouni , El Akrem. Les métabolites secondaires chez des plantes aromatiques et médicinales: Bioprospection, investigation phytochimique et valorisation technofonctionnelle en bio-industries. doctorat Génie biologique, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Tunisie, 2009.
- [20]. Khlifi, D. Hamdi, M. El Hayouni, A. Cazaux, S. Souchard, J, P. Couderc, F and Bouajila ,J. Global chemical composition and antioxidant Tuberculosis activities of various extracts of Globularia alypum L (Globulariaceae) leaves. *Molecules*, 16 (2), 2011, 10592-10603.
- [21]. Khlifi, S. El Hachimi, Y. Khalil , A. Es-Safi N, El Abbouyi A . In vitro E effect of Globularia alypum L. hydromethanolic extract. *Indian J Pharmacol*, 37, 2005, 227-231.
- [22]. Harzallah, HJ. Neffati ,A. Skandrani, I. Maaloul, E. Chekir Ghedira ,L. Mahjoub T. Antioxidant and antigenotoxic activities of Globularia alypum leaves extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* , 4(19), 2010, 2048-2053.
- [23]. Ben Mansour, R. Gargouri 2, B. Gargouri 1, B. Gharbi , Elloumi , N . Ben Haj Jileli, I. Gharbi Gammar, Z. Lassoued, S. Investigation of antioxidant activity of alcoholic extract of Globularia alupum L. *J. of Medicinal Plants Research*. 6 (25), 2012, 4193-4199.
- [24]. Es-Safi , NE. Kollman, A. Khlifi, S. Ducrot , PH. Antioxidative effect of coumpounds isolated from Globularia alypum L. Structure activity relationship. *Science direct*, 40, 2007, 1246-1252.
- [25]. Es-Safi, N,E. Khlifi ,S. Kollmann, A. Kerhoas, L. El Abbouyi, A. Ducrot, PH Iridoid glucosides from the aerial parts of Globularia alypum L.(Globulariaceae). *Chem. Pharm. Bull.*, 54, 2006, 85-88.
- [26]. Ozsoy, N. Can, A., Yanadag, R and Akev, N. Antioxidant activity of Smilax excels L. leaf extracts. *Food Chemistry*, 105, 2008, 204-214.
- [27]. Bousoulim Naouel. Activité biologiques de plantes médicinales : Anchusa azurea Mill et Globularia alypum L. doctorat en Sciences : option microbiologie. Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 2014.
- [28]. Taghzouti, O, K. Balouiri, M. Ouedrhiri ,W. Chahad, A, E. Romane, A. In vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of Globularia alypum L. extract. *J.Mater. Environ. Sci*, 7 (6), 2016, 1988-1995.

Khantouche Linda "Dosage des poly phénols et étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des différents extraits des feuilles du Globularia alypum L.." *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)* 12.1 (2018): 68-74.