

II. 1. Tests phytochimiques

II. 1. 1. Matériel végétal et préparation de l'extrait

La plante été ramenée de la région de Constantine. La partie aérienne a été lavée, séchée à température ambiante à l'obscurité, ensuite finement broyée.

II. 1. 2. Criblage phytochimique

Les différentes analyses chimiques sont effectuées par un criblage phytochimique. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation (voir annexe 01). Celle-ci est effectuée sur la poudre végétale et/ou extrait aqueux. Le tableau I indique les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés.

Tableau I : Réactifs spécifiques et réactions positives du criblage phytochimique.

Groupes chimiques	Réactifs et résultats positifs
Polyphénols	Chlorure de fer \longrightarrow coloration bleu-noirâtre ou verte
Flavonoïdes	Alcool chlorhydrique et copeaux de magnésium \longrightarrow coloration rose-orangé
Alcaloïdes	Burchard et Dragendorff \longrightarrow coloration rose-orangé ou violacée
Tanins	Chlorure de fer \longrightarrow coloration bleu-noirâtre et précipité
Saponosides	Observation d'une mousse (après forte agitation)
Coumarines	Hydroxyde de sodium \longrightarrow fluorescence jaune
Anthocyanes	Ammoniaque \longrightarrow coloration bleue

III. 2. Evaluation des activités biologiques**II. 2. 1. Activité antidiabétique****II. 2. 1. 1. préparation de l'infusé**

L'extrait aqueux a été préparé selon la méthode traditionnelle; environ 6 g de la poudre de plante sont mis dans de l'eau bouillante. L'infusé est laissé refroidir pendant 15 minute à température ambiante. Après filtration, le volume final est noté pour le calcul des différentes doses administrées. Il est utilisé tel qu'il est pour le test antidiabétique sur les animaux.

II. 2. 1. 2. Les animaux

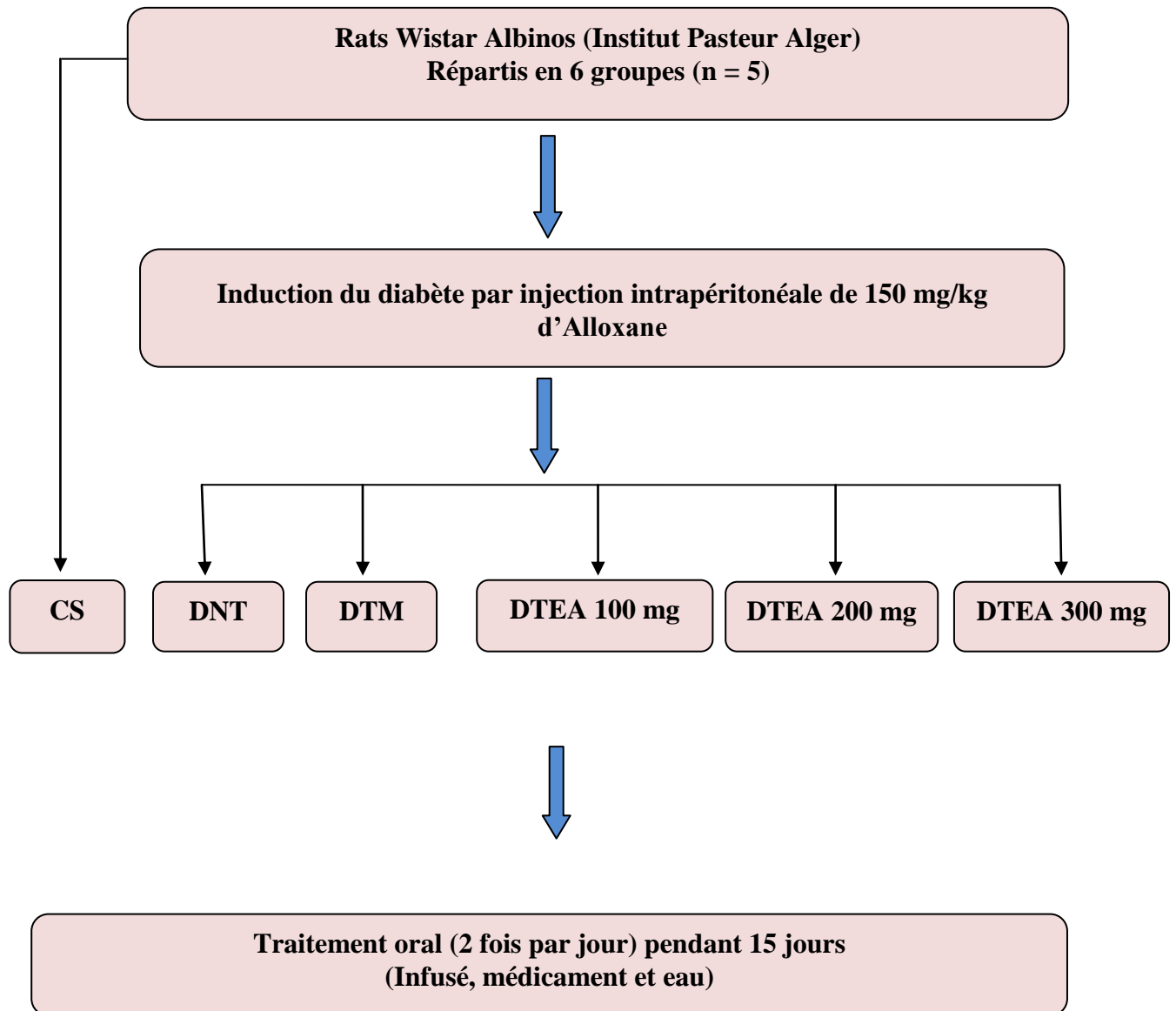
Des rats Wistar Albinos ont été ramenés de l'Institut de Pasteur d'Algérie (Centre d'élevage, Kouba, Alger). Ils ont été acclimatés aux conditions de l'animalerie pendant une semaine. Les animaux ont été alimentés ad libitum avec de l'eau et le régime de croquette (Office Nationale de l'Alimentation du Bétail, Bejaia) dont les composants majeurs sont le maïs, le son, le soja et les compléments vitaminiques. Ils ont été gardés et maintenus dans les conditions de température et de lumière ambiante.

II. 2. 1. 3. Induction du diabète

Les rats ont été injectés par voie intrapéritonéale avec du monohydrate d'alloxane (Sigma-Aldrich, USA) dissous dans l'eau saline stérile à une dose de 150 mg/kg de poids corporel. Après 3 jours, l'hyperglycémie a été confirmée en utilisant un glucomètre Actif Accu-Chek (Roche Diagnostic, Allemagne). Seuls les rats avec des taux de glucose sanguin supérieur à 200 mg/dl ont été choisis et utilisés dans cette étude (Matteucci et Giampietro, 2008).

II. 2. 1. 4. Protocole expérimental de diabète

Les rats ont été aléatoirement divisés en six groupes, chaque groupe est composé de cinq rats, selon la figure 02.



CS: contrôle sain; **DNT:** Diabétiques non traités; **DTM:** Diabétiques traités par 5 mg/kg de glibenclamide; **DTEA 100 mg:** Diabétiques traités par 100 mg/kg p.c. l'extrait aqueux de plante; **DTEA 200 mg:** Diabétiques traités par 200 mg/kg p.c. l'extrait aqueux de plante; **DTEA 300 mg:** Diabétiques traités par 300 mg/kg p.c. l'extrait aqueux de plante.

Figure 02: Protocole expérimental.

Les préparations (médicament, infusé et eau) sont données oralement aux rats des six groupes deux fois par jour pendant 15 jours.

II. 2. 1. 5. Suivi des animaux avant sacrifice

- **Poids corporel**

Les rats ont été pesés chaque cinq jour grâce à une balance (KERN).

- **Glycémie**

Le sang a été prélevé de la queue du rat avant l'administration d'extraits pour la détermination du taux de glucose sanguin en utilisant un glucomètre Accu-Chek. Les résultats ont été exprimés en termes de milligramme par décilitre de sang. Le pourcentage de diminution de la glycémie est calculé de la manière suivante:

$$\% \text{ de diminution de la glycémie} = [(glycémie \text{ finale} - glycémie \text{ initiale}) / glycémie \text{ initiale}] \times 100.$$

- ✓ (+): indique une augmentation de la glycémie.
- ✓ (-): indique une diminution de la glycémie.

II. 2. 1. 6. Dosages biochimiques sanguin après sacrifice

A la fin des 15 jours du traitement, les rats sont sacrifiés le matin à jeun. Le sang est immédiatement recueilli dans des tubes pour le dosage des différents paramètres biochimiques. Le taux du glucose, le cholestérol, les triglycérides, les lipides totaux ont été mesurés. Tous les paramètres ont été dosés selon la fiche technique Spinreact (voir annexe 02).

III. 2. 2. Activité antioxydante

III. 2. 2. 1. Test au DPPH

- **Principe**

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Figure 03) (Matkowski and al.,2008).

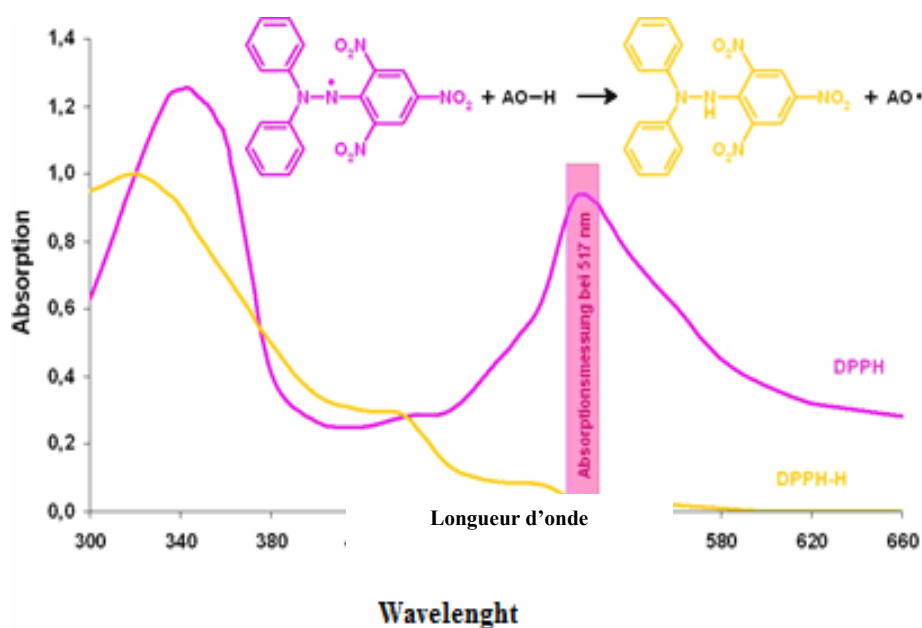


Figure 03: Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive

Dans des tubes on introduit 50 μ l de différentes concentrations (0,0125 à 5 mg/ml) de l'extrait et 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée, après agitation au vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm (Spectrophotometer UV-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons (Bougandoura et al., 2013).

- **Expression des résultats**

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante:

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

Où

- ✓ I% : pourcentage de l'activité anti-radicalaire
- ✓ Abs test: absorbance de l'échantillon
- ✓ Abs Contrôle positif: absorbance du contrôle négatif

Les valeurs de l'IC₅₀ ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire (Bougandoura et al., 2013). Les essais ont été effectués en Triple.

II. 2. 3. Activité antibactérienne

II. 2. 3. 1. Microorganismes utilisés

Trois souches microbiennes issues des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection) ont été utilisées: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Staphylococcus Epidermidis* (ATCC 12228). Ces bactéries sont responsables de l'infection du pied chez le diabétique, si la prise en charge n'est pas rapide, il risque l'amputation.

III. 2. 3. 2. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque)

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes a une grande influence sur les résultats. A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Dans cette étude, nous avons choisi la technique en milieu solide.

Après deux repiquages successifs sur bouillon nutritif et un isolement sur milieu gélosé spécifique (gélose Muller Hinton), des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions bactériennes ayant une turbidité (exprimé par la mesure de la Densité Optique à 600 nm) voisine à celle de McFarland de 0.5. Une DO de 0.08-0.1 correspond à 10⁸ UFC/ml (Yakhlef et al., 2011). Par la suite la surface entière de la gélose Mueller Hinton a été étalée par cette suspension bactérienne.

L'extrait de *Linaria reflexa* est dissous dans du DMSO à raison de 400 mg/ml. Plusieurs concentrations ont été testées (25 – 50 – 100 – 250 – 400 µg/ml).

Des disques stériles de 6 mm de diamètre (papier Whatman n°3) imprégnés de 30 µl d'extrait de plante par disque, ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 1 à 2 h ensuite incubées 24 h à 37°C.

L'activité antimicrobienne a été déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Toutes les expériences ont été réalisées en double.