

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمّار تليدي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم علوم المادة
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie Organique Appliquée

Présenté par :
RICHE Lilia Narimane
HADDADI Khadidja

THEME

Etude *in vitro* de l'effet des extraits des fruits du Pistachier de l'Atlas sur la cristallisation oxalocalcique et l' α -amylase

Soutenu publiquement le 23/06/2019 devant le jury composé de :

DJERIDANE Amar	Pr	Président
BENALIA Mohamed	MCB	Examineur
GUENANE Hamid	MCB	Examineur
YOUSFI Mohamed	Pr	Encadreur

Année Universitaire : 2018- 2019

Dédicace

Je dédie ce modeste travail aux êtres qui me sont les plus chers, je cite :

*Les parents les plus chers au monde, **Papa** et **Maman**, que dieu les garde et les protège.*

*A mes frères **Amine** et **Hicham**.*

*A ma grande mère maternelle **FERHAT Zohra**.*

A toute ma famille et à tous mes chers amis.

*A mon binôme **KHADIDJA** et toute la famille **HADADDI**.*

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin je vous dis merci.

*Et à mon professeur **YOUSFI MOHAMED** qui doit voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.*

RJCHE Lilia

Dédicace

Je dédie ce travail à ceux que je chéris dans le monde :

A ma mère est émotionnelle, patiente, toujours présente dans les moments les plus difficiles de ma vie.

A mon père qui me fait toujours confiance dans la formation continue pour inculquer de vraies valeurs et de précieux conseils de vie,

A mes frères et soeurs, à mon cher mari pour l'encourager à continuer tout au long de mon travail, A et toute la famille

A mon binôme Lilia a tous mes chers amis **Souhila, Souad** et **Wissam**

HADDADJ Khadidja

Remerciement

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de ***Mr. YOUSF Mohamed***, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également aux : ***Mr. DJERIDANE Amar, Mr BENALIA Mohamed*** et ***Mr. GUENANE Hamid***, qui nous font l'honneur de participer à notre jury de soutenance.

Nous remercions aussi ***Mr. HARRATH Mohamed. M^{lle} MAHFOUDI Reguia*** et tous les chercheurs de laboratoire des sciences fondamentales pour leur assistance très bénéfiques. A toutes les personnes qui ont contribué à l'obtention de ce diplôme. Nous pensons en particulier à tous les enseignants qui nous ont accompagnés durant les années d'étude.

Enfin, notre grand attachement à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin, surtout ceux que nous avons involontairement omis de citer.

Liste des Figures

Figure 01: Distribution de <i>Pistacia atlantica</i> en Algérie.....	39
Figure 02 : Les étapes de formation des calculs.....	39
Figure 03 : Produit de dégradation de l'amidon par l'alpha-amylase.....	40
Figure 04 : Fruit de <i>Pistacia atlantica</i>	8
Figure 05 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	18
Figure 06 : Courbe cinétique de la réaction de la cristallisation oxalocalcique.....	20
Figure 07 : Courbe d'étalonnage du pourcentage d'inhibition % du médicament Phabiol en fonction de concentration en mM.....	21
Figure 08 : courbe d'étalonnage du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration du médicament en mM.	25

Liste des tableaux

Tableau 01 : Travaux intérieur sur le <i>Pistacia Atlantica</i>	34
Tableau 02 : Classement des inhibiteurs.....	35
Tableau 03 : Plantes étudiées dans un système in vitro.....	36
Tableau 04 : Quelques médicaments anti diabétique actuellement commercialisés.....	37
Tableau 05 : Mode d'actions de quelques plantes antidiabétiques utilisées dans le monde.....	38
Tableau 06 : Réactifs chimiques utilisés.....	8
Tableau 07 : Concentrations et rendements des extraits.....	15
Tableau 08 : Concentrations et quantités des composés phénoliques dans les extraits.....	17
Tableau 09 : Pourcentage d'inhibition des calculs rénaux.....	20
Tableau 10 : Pourcentage d'inhibition d'alpha-amylase.....	24

Liste des abréviations

A₀	Absorbance mesurée en absence de l'inhibiteur.
A_E	Absorbance mesurée en présence de l'inhibiteur.
AEIC	Acarbose équivalente inhibitrice capacité. (Acarbose equivalente inhibitory capacity)
D%	
EAG	Equivalent en acide gallique.
IP	Indice de polarité
M_e ,	Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant,
M_v .	Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.
ml	Milli litre
min	Minute
mM	Milli mol par litre
pH	Potentiel d'hydrogène
g/l	Gramme par litre
PECAL	Pharbiol équivalent capacité inhibitrice anti-urolithiasique,(Pharbiol equivalente capacity anti-urolithiasic)
UV-Vis	Ultra-violet-Visible
R (%)	Rendement en %.
Q	Quantité des composés phénolique en mg/100g

Sommaire

Remerciements

Liste des Figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

I. Introduction générale.....2

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Matériel végétale.....8

II.1.2. Produits chimiques.....8

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des extraits.....9

II.2.2. Détermination de rendement d'extraction.....9

II.2.3. Dosage des polyphénols9

II.2.3.1. Principe de la méthode.....10

II.2.3.2. Protocole expérimental.....10

II.2.4. Evaluation de l'activité anti-urolithiasique des extraits.....10

II.2.4.1. Principe de la cristallisation de l'oxalate de calcium10

II.2.4.3. Test d'inhibition sur la cristallisation.....11

II.2.5. Modèle gravimétrique11

II.2.6. Etude de l'effet inhibiteur de l' α -amylase.....11

II.2.6.1. Inhibition de l' α -amylase11

II.2.6.3. Le test d' α -amylase11

III. Résultats et discussion

III.1. Concentration des extraits bruts14

III.2. Dosage des composés phénoliques.....16

III.3. Evaluation de l'activité anti-urolithiasique des extraits.....18

III.4. Modèle gravimétrique22

III.5. Etude de l'effet inhibiteur de l' α -amylase.....22

IV. Conclusion générale.....27

V. Références bibliographiques.....30

VI. Annexes

Introduction
générale

Le Pistachier de l'Atlas (*Pistacia Atlantica Desf.*), ou encore « Bétoum » de la famille des anacardiacees est l'espèce végétale la plus caractéristique de l'Atlas de l'Algérie comme l'indique son nom. Son arbre de hauteur entre 5 et 15 mètres, d'un diamètre de 1 mètre, pousse dans les régions présahariennes du pays. Ses fruits sont de petites graines vertes de 8 mm de taille, leurs feuilles sont caduques et chutent en automne, elles sont de couleur vert pâle, Les fleurs mâles et femelles sont portées par des pieds différents. Mais quelques pieds monoïques ont été observés dont les fleurs mâles et femelles sont portées par des rameaux différents, Le fruit est une drupe, dont le nom vernaculaire est "Khodiri". Il est consommé par les habitants. La fructification débute vers la fin du mois de mars et les fruits atteignent leur maturité au mois de septembre. Le Pistachier de l'Atlas a une inflorescence en grappe rameuse. La floraison qui apparaît juste avant la feuillaison débute la mi-mars. C'est un arbre qui pousse dans tous les types de sol, il supporte la sécheresse et le froid hivernal. Il est devenu rare à cause de son exploitation abusive à des propriétés sumac et un arôme et colorant. **(Shahouzehi, Sepehri et al. 2018)**. Le Pistachier de l'Atlas est largement distribué au sud de la méditerranée et dans le Moyen-Orient.

En Algérie c'est une espèce endémique qui figure parmi les plantes non cultivées protégées en Algérie. On le trouve disséminé dans les forêts chaudes du tell méridional mais surtout dans la région steppe désertique des hauts plateaux et du Sahara septentrional où il ne subsiste que dans les Dayas. On le rencontre parfois en montagne dans l'Atlas saharien (régions Aflou et Ain Sefra) et sur les hauts plateaux oranais.

Le Pistachier de L'Atlas est un arbre par excellence de la daya du piedmont méridional de l'Atlas saharien, sa limite extrême se trouve en pleine cœur du Hoggar où il existe à l'état de relique. Il se trouve surtout dans la zone de transition entre la steppe et le tell (Figure01 voir l'annexe) **(MANSOUR 2011)**.

Les espèces du genre *Pistacia* occupent une place appréciable dans la médecine traditionnelle et pharmaceutique depuis l'antiquité. Elles attirent l'attention des chercheurs grâce à ces potentiels antioxydants et ces activités antimicrobienne, anti-inflammatoire, antipyrétique, antidiabétique, anti-radicalaire et cytotoxique. Elles sont employées dans le traitement d'eczéma, les infections de la gorge, la lithiase rénale, l'asthme, l'estomac et comme un stimulant. Il existe d'autre utilisation tel que : comme antiseptique, antifongique et dans les maladies abdominales. **(Ben Ahmed, Yousfi et al. 2017; Mahjoub, Rezayat et al. 2018)**.

Pistacia atlantica est une espèce principale de la production d'oléorésine. Cette résine qui est produit par l'écorce et exsudé naturellement de façon abondante par temps chaud est utilisée comme antiseptique du système respiratoire et aussi pour d'autres usages médicaux. Chez les

marocains, la décoction des feuilles est largement employée pour traiter les infections de l'œil. Les fruits trouvent leur application dans la cuisine et les pratiques médicinales algériennes en particulier, dans la région de Djelfa, Laghouat et Ghardaïa. L'huile de ces fruits comestibles est souvent mélangée aux dattes écrasées et peut-être consommé à toute heure de la journée avec du petit lait. L'huile a un goût très proche de celui du beurre, elle est très appréciée dans la région. Les graines sont séchées, écrasées ou moulues et ramassées avec de l'eau sucrée et consommées en boulettes ou bien séchées et croquées telles quelles comme des cacahuètes(Djemoui 2003).

Beaucoup de travaux de recherches phytochimiques ont été réalisés sur les différentes parties du Pistachier de l'Atlas (fruits, galles, feuilles). Ces travaux ont montré que l'arbre est une source importante de molécules bioactives qui possèdent des activités antioxydantes et biologiques certaines, les composés chimiques isolés et leurs structures et les références bibliographiques relatives sont résumés dans le tableau 01 (voir annexe). Les résultats de ces recherches confirment et justifient l'utilisation de cet arbre en médecine traditionnelle et par conséquent nous permet de classer l'arbre de Pistachier de l'Atlas comme plante médicinale.

Les vertus thérapeutiques des plantes médicinales ont lui permis d'avoir une grande importance pour la santé des individus et des communautés (Lartigau-Roussin 2002) De ce fait, l'organisation mondiale de la santé a soutenu l'établissement d'une base pour la conservation des plantes médicinales et a encouragé les pays en voie de développement à organiser la médecine traditionnelle dans des cadres réglementaires. Ainsi, des milliers de plantes médicinales recensées à ce jour sont utilisées par 80 % de la population mondiale pour lutter contre diverses maladies. Donc la recherche a été concentrée sur l'évaluation scientifique des drogues traditionnelles de l'origine végétale qui sont riches en des produits du métabolisme secondaire comme, les polyphénols, les huiles essentielles, les alcaloïdes,etc... (Amar, Harrache et al. 2010).

En Algérie, la médecine douce est encore largement sollicitée par la population pour plusieurs raisons qui se trouvent être les mêmes dans d'autres pays. Essentiellement, les patients ne sont pas satisfaits des traitements qu'ils reçoivent et perdent confiance envers leurs médecins et préfèrent des cures à base de plantes qui semblent être plus naturelles, sans effets secondaires inévitables et pas coûteuses. Par exemple dans le cas de la lithiase urinaire, les médicaments conventionnels comme les diurétiques, les anti-inflammatoires et les inhibiteurs de certains métabolites sont les seuls médicaments utilisés dans le traitement de la lithiase oxalocalcique, avec des effets secondaires néfastes (Juyal, Bisht et al. 2010).

La lithiase urinaire, urolithiase ou anciennement « maladie de la pierre » est une maladie due à la présence de calculs dans le corps humain (rein, vessie, uretère,...). Cette précipitation se fait le plus

souvent à partir des constituants normaux de l'urine. On considère que 2 à 15% de la population mondiale souffre de calculs urinaires. La fréquence est la plus élevée entre 30 et 50 ans, avec une nette prédominance masculine. **(Mahjoub, Rezayat et al. 2018)**.

❖ Il existe quatre types d'urolithes définis par leur composition :

Calculs d'oxalate de calcium CaC_2O_4 , Calculs de struvite $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Calculs d'acide urique $\text{C}_5\text{H}_2\text{N}_4\text{O}_3$, Calculs de cystine $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ **(Djemoui 2003)**.

La cristallisation se fait en trois étapes :

- La nucléation : c'est l'apparition de petits cristaux appelés germes cristalline.
- La croissance cristalline : les germes déjà formés se transforment en cristaux.
- L'agrégation cristalline : les cristaux s'agglutinent.

Le processus de la lithogénèse peut être décomposé en six étapes qui se succèdent au s'entremêlent au cours de la formation d'un calcul résumé dans (la figure 02 voir l'annexe). **(Djemoui 2003)**

Les inhibiteurs sont classés en trois groupes suivant leurs effets sur la cristallisation, on désigne deux classes d'inhibiteurs en fonction de leurs poids moléculaires. **(Djemoui 2003)** (Tableau 02 voir annexe).

En plus beaucoup d'études ont été consacrés à la recherche des inhibiteurs naturels des calculs à base de plantes médicinales **(Mahjoub, Rezayat et al. 2018)**. Dans le laboratoire où nous avons réalisé ce travail, on peut citer à titre d'exemple les travaux de BENALIA. **(Benalia)**. Le tableau 03 (Voir annexe), résume quelques travaux sur le sujet en question.

Le diabète sucré est la maladie non infectieuse la plus fréquente. Il a été estimé que 347 millions de personnes ont été touchées globalement en 2011 et il sera doublé jusqu'en 2030. C'est un trouble complexe causé par une augmentation de la production hépatique de glucose, une diminution de l'insuline et aucune production d'insuline, conduisant à augmenter le niveau de glucose dans le sang. Il est classé en deux types : le diabète de type 1 (IDDM) et le diabète sucré de type 2 et la forme la plus prévalent de cette maladie est le diabète sucré non insulino-dépendant (NIDDM 2), lié à une hyperglycémie postprandiale élevée. Toutefois, les tentatives thérapeutiques sont très intenses dans ce domaine et diverses approches pharmacologiques sont utilisées pour améliorer le traitement du diabète par différents modes d'action. Parmi ces stratégies est de réduire ou ralentir la digestion et l'absorption des glucides alimentaires par l'intermédiaire de l'inhibition des principales enzymes hydrolysant les glucides ingérés l' α -amylase et l' α -glucosidase dans les organes digestifs. Cependant, il existe de nombreuses enzymes digestives chez l'homme dont la

plus importante est l'alpha-amylase pancréatique, qui hydrolyse les liaisons alpha-1,4 glycosidiques de l'amidon, l'amylopectine, l'amylose, le glycogène et de nombreuses maltodextrines) (**Lebovitz 1997**).

L' Amylase hydrolyse l'amidon, le glycogène, et la dextrine pour former le glucose, le maltose et les dextrans. Dans le processus digestif des hydrates de carbone diététiques complexes, l' α -glycosidase et l' α -amylase jouent un rôle important. Donc, l'inhibition des deux enzymes peut retarder la digestion des oligosaccharides et des disaccharides, et retarder l'absorption du glucose ainsi que réduire les taux de glucose dans le plasma, aboutissant finalement à la suppression de l'hyperglycémie postprandiale(**Lebovitz 1997**), (figure 03 voir l'annexe) .

La thérapie du diabète consiste principalement à stimuler la sécrétion de l'insuline, diminuer la production hépatique du glucose et/ou réduire la résorption intestinale des hydrates de carbones. L'activité biologique des médicaments antidiabétique résulte de leur interaction avec des macromolécules cibles qui déclenche une cascade d'évènements qui aboutira à l'effet pharmacologique différentes cibles d'action des antidiabétiques sont donc potentielles parmi lesquelles : Glucagon-like peptide-1 (GLP1) et la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4), les enzymes de digestion des carbohydrates, le récepteur membranaire spécifique des cellules bêta (SUR1) et autres. Le tableau 04(Voir annexe), regroupe quelques médicaments anti diabétique actuellement commercialisés.

Beaucoup de chercheur sont s'intéressés de trouver des molécules ou des extraits naturels qui inhibent les deux enzymes, l' α -glycosidase et l' α -amylase afin de remplacer les médicaments de synthèse qui ont montré des effets secondaires sur les malades. Le tableau05 (Voir annexe) contient quelques études menues sur des plantes médicinales ayant des activités inhibitrices sur les deux enzymes responsables à la maladie du diabète (**Motomura, Fukuzawa et al. 2009**).

L'objectif de notre travail, consiste d'évaluer l'étude de santé des populations par l'utilisation des médicaments à base de plantes médicinales et plus spécifiquement de proposer une solution possible aux problèmes liés au lithiase et au diabète.

L'utilisation des tisanes des fruits de Pistachier de l'Atlas par la population locale à des fins anti-lithiasique, en plus la relation existante entre l'influence du diabète sur les reins nous ont incité à étudier en parallèle l'effet inhibiteur des extraits des fruits de Pistachier de l'Atlas sur la cristallisation de l'oxalate de calcium et l'alpha amylase. Nous avons essayé de trouver une relation entre ces deux phénomènes et de classer les extraits en fonction de leurs effets inhibiteurs.

Notre travail s'inscrit principalement à l'étude de l'effet inhibiteur des extraits polaires des fruits de Pistachier de l'Atlas récoltés dans la région de Laghouat sur la cristallisation d'oxalate de calcium et l'alpha amylase enzyme liée à la maladie du diabète. A notre connaissance aucune étude n'a été entreprise pour étudier l'activité anti lithiasique des différents extraits des fruits de Pistachier de l'Atlas. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle turbidimétrie car ce modèle présente plusieurs avantages, la bonne reproductibilité, suivi de la cristallisation d'une façon continue, quantifier l'effet inhibiteur par la mesure des absorbances. Une autre partie de ce travail porte sur l'étude de l'effet inhibiteur des mêmes extraits sur l'alpha amylase. Les conditions optimales (température, PH proches aux conditions physiologiques du corps humain sont prises en considérations).

Notre travail contient une partie sur le matériel et les réactifs utilisés et une deuxième partie est relative à la présentation de nos résultats et leur discussion. On termine par une conclusion et des perspectives.

Matériel

Et

Méthodes

II.1. Matériel :

II.1.1. Matériel végétal :

Nous nous sommes intéressés dans notre travail aux fruits matures de couleur verte. Ont été récoltées de la région El Ghaicha (Laghouat), au mois d'octobre 2018. Les fruits sont séchés à l'abri de la lumière pendant 2 mois.



Figure 04 : fruit de *Pistacia atlantica*.

II.1.2. Produits chimiques : Tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé (**Tableau 06**).

Tableau 06 : Réactifs chimiques et médicaments utilisés.

Produits	Fournisseur
Méthanol, éther de pétrole, Dichlorométhane CH_2Cl_2 , Acétate d'éthyle, chlorure de calcium CaCl_2 , tartrate de potassium et de sodium $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, Hydroxyde de sodium NaOH , Sulfite de sodium Na_2SO_3 , Acide 3-5 dinitrosalicylique DNS, Hydrogénophosphate de potassium K_2HPO_4 , Hydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 , bicarbonate de sodium Na_2CO_3 , l'acide gallique, sulfate de sodium, enzyme	Sigma- Aldrich.P
Phénol cristallin, Amidon	Riedel-de Haen.P
Folin-Ciocalteu	BIOCHEM.P
Chlorure de sodium NaCl	VWR- PROLABO.P
Chlorure de potassium KCl , oxalate de sodium $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	BHD.P
Gluconova (acarbose)	
Succinimide pharbiol 3 g	

II.2. Méthodes :

II.2.1. Préparation des extraits :

❖ Préparation d'extrait hydrométhanolique :

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des principes actifs, dans notre travail nous avons choisi un montage à reflux. En ce qui concerne cette extraction, 10g fruits mûres broyées sont portées à l'ébullition dans 100 ml d'eau distillée durant une heure et demi. Ensuite une filtration sur papier filtre. Les filtrats obtenus ont été concentrés par évaporation sous vide à l'aide d'un Rota vapeur à 40 °C, jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Une autre extraction à reflux a été réalisée sur 10 g de la matière végétale broyée (fruit) par 6 systèmes de solvants : méthanol (100%), méthanol : eau (8 :2) et (7 :3), (6 :4), (5 :5) et (4 :6), et après 1 heures et demi, puis une filtration sur papier filtre. Le filtrat est évaporé sous vide à l'aide d'un Rota vapeur à 40 °C, après évaporation du méthanol la solution aqueuse résiduelle est soumise à une série d'extractions de liquide-liquide.

❖ Extraction liquide-liquide :

L'extraction liquide-liquide se fait en ajoutant (2×100 ml) d'éther de pétrole ensuite (2×100 ml) de dichlorométhane CH₂Cl₂ et enfin (2×100 ml) d'acétate d'éthyle. L'extraction liquide-liquide permet d'obtenir 4 fractions de chaque système de solvant (3 fractions organiques et une fraction aqueuse). Après chaque extraction on ajout anhydride de sodium pour éliminer les traces d'eau après filtration on évapore sous vide à l'aide d'un Rota vapeur 40 °C, puis le résidu sec obtenu est pesé et solubilisé dans 10 ml du méthanol absolue, et d'eau distillée selon la solubilisation des résidus. Les extraits ainsi obtenus sont conservés jusqu'à leur utilisation.

II.2.2. Détermination des rendements de l'extraction :

Le rendement des différents extraits obtenus est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé par l'équation :

$$\mathbf{R (\%) = (M_e / M_v) \times 100}$$

II.2.3. Dosage des polyphénols :

La méthode adoptée dans le dosage des polyphénols de notre extraits est la méthode de Folin-Ciocalteu est l'une des méthodes adoptées dans la plupart des travaux concernant les antioxydants naturels, elle est considérée comme étant la meilleure méthode pour la quantification des polyphénols totaux. Cette méthode repose sur la capacité d'un phénol à réduire le réactif Folin-Ciocalteu de couleur jaune constitué de l'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolibdique en milieu alcalin,

en un mélange de tungstène et de molybdène de couleur bleue, dont l'absorbance maximale est comprise entre 700-760 nm. (**Boizot and Charpentier 2006**).

II.2.3.2 Protocole expérimental :

Pour la réalisation de la courbe d'étalonnage, différentes concentrations de l'acide gallique allant de 0.03 à 0.3 g/l ont été préparées.

100 µl de chaque extrait ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis par l'addition de 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). Après incubation pendant 2 minutes, 2 ml de carbonates de sodium Na_2CO_3 à 2% ont été ajoutées, puis les solutions ont été secouées immédiatement et sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc sur un spectrophotomètre UV-Visible de type UV-1601. La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir une courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique (mg/g EAG) par gramme de la matière sèche.

II.2.4. Evaluation de l'activité anti-urolithiasique des extraits :

II.2.4.1. Principe de la cristallisation de l'oxalate de calcium :

Ce modèle consiste à l'étude de la cristallisation oxalocalcique entre le chlorure de calcium CaCl_2 et l'oxalate de sodium $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, sans et avec inhibiteur, afin d'évaluer la capacité inhibitrice des extraits préparés. (**Giocanti, Hennequin et al. 1993**).

II.2.4.3. Test d'inhibition sur la cristallisation :

Avant de procéder aux tests, nous avons réalisé une cinétique pour confirmer que la réaction n'évolue plus après 5 min nous avons tracé une courbe de l'absorbance en fonction du temps.

Pour le test d'inhibition avec l'extrait, on mélange dans une cuve un volume de 500µl (60 mmol/l) de solution de chlorure de calcium CaCl_2 avec 500 µl de solution inhibitrice (extraits) et 500 µl (20mmol/l) de la solution d'oxalate de sodium $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Les conditions optimales (température, pH proches aux conditions physiologiques du corps humain sont prises en considérations), après incubation de 5 min on mesure l'absorbance à une longueur d'onde 620 nm. Par contre pour l'essai sans inhibiteur on mélange dans une cuve un volume de 500µl (60 mmol/l) de solution de chlorure de calcium CaCl_2 avec 500 µl (20mmol/l) de la solution d'oxalate de sodium $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, 500 µl de méthanol ou bien l'eau distillée, Les conditions optimales (température, pH proches aux conditions physiologiques du corps humain sont prises en considérations), après incubation de 5 min on

mesure l'absorbance à une longueur d'onde 620 nm. Le pourcentage d'inhibition anti-uroolithiasique est calculé par la relation suivante.

$$\text{PI \%} = ((A_0 - A_E) / A_0) \times 100$$

II.2.5. Modèle gravimétrique :

Pour le modèle gravimétrique, nous avons choisi la fraction acétate d'éthyle et la fraction aqueuse pour le système de solvant 4 :6 qui ont montré un bon effet sur l'inhibition de la réaction oxalocalcique. Deux calculs rénaux de masse 0,1163 g et 0,1009 g sont lavées par de l'eau distillée, puis séchées dans une étuve 40°C pendant 24 heures. Après séchage les calculs sont incubés dans 2ml d'extraits d'acétate d'éthyle et eau de concentrations 77,7g/l, 162,84g/l respectivement. Après un mois d'incubation dans une étuve maintenue à une température 37°C. Après la récupération des calculs, ils sont lavés par de l'eau distillée puis séchées à 40°C pendant 24 heures. Le pourcentage de dissolution des calculs est calculé par la relation suivante :

$$\text{D \%} = ((m_0 - m_f) / m_0) \times 100$$

II.2.6. Etude de l'effet inhibiteur de l' α -amylase :

II.2.6.1. Inhibition de l'alpha-amylase :

Dans le processus digestif des hydrates de carbone diététiques complexes, l' α -amylase joue un rôle important. Donc l'inhibition de l'enzyme peut retarder la digestion, et retarder l'absorption du glucose ainsi que réduire les taux du glucose dans le plasma, aboutissant finalement à la suppression de l'hyperglycémie postprandiale (**Lebovitz, 1997**).

II.2.6.2. Le test d'alpha-amylase :

Pour l'essai avec inhibiteur on mélange dans un tube à essais 200 μ l de tampon (pH=7), avec 100 μ l de l'extrait et 100 μ l de substrat (10g/l), après incubation à 37°C pendant 5min, on ajoute 100 μ l d'enzyme (13UI/ml). Après une autre préincubation à 37°C pendant 4min, on ajoute 1ml de DNS, puis on chauffe à 100°C pendant 5min, après refroidissement le mélange est dilué avec 3 ml d'eau distillée. Par contre nous avons ajouté dans un tube à essais 300 μ l de tampon (pH=7) et 100 μ l de substrat (10g/l), après incubation à 37°C pendant 5 min, en suite on ajoute 100 μ l d'enzyme (13UI/ml), préincubation à 37°C pendant 4 min. On ajoute 1ml DNS, puis chauffage à 100°C pendant 5min, on laisse refroidir puis on dilue avec 3 ml d'eau distillée.

Les mesures de densités optiques au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Les valeurs de l'absorbance nous ont permis d'exprimer le pourcentage d'inhibition (I %) de alpha-amylase de chaque extrait qui est calculée selon la relation suivante :

$$\mathbf{I \% = ((A_0 - A_E) / A_0) \times 100}$$

Résultats

Et

Discussion

III.1. Concentration des extraits bruts :

Le tableau 07 regroupe les résultats concernant les concentrations des fractions en mg/ml et les teneurs g/100g des extraits des fruits de Pistachier de l'atlas. Rappelons que nous avons préparé des extraits de fruits de Pistachier de l'atlas en utilisant trois système de solvants à savoir : 100% méthanol, 100% eau distillée et des mélanges volumiques hydrométhanolique avec des proportions 8 :2 ; 7 :3 ; 6 :4 ; 5 :5 et 4 :6 V/V. Pour les extraits des mélanges méthanol : eau, on remarque que les meilleurs rendements et concentrations sont enregistrés chez les fractions aqueuses. Les valeurs des concentrations s'échelonnent entre 106,29 g/l dans le solvant 6 :4 V/V et 882 ,89 g/l dans le solvant 8 :2 V/V. La même remarque est aussi enregistrée pour les rendements, car le solvant 6 :4 V/V a montré le rendement le plus faible 10,62% m/m, par contre le meilleur rendement était pour le solvant 8 :2 V/V et qui est égal 82,35% m/m. Les fractions de dichlorométhane se classent en deuxième position en concentrations et en rendements. L'extrait 6 :4 V/V a enregistré les plus faibles valeurs en concentration et en rendement (40,25 g/l et 4,02% m/m), par contre l'extrait 4 :6 V/V a enregistré les plus grandes valeurs en concentration et en rendement (84,97 g/l et 8,46% m/m). Les fractions d'acétate d'éthyle ont montré des concentrations et des rendements plus faibles que celles des extraits aqueux et dichlorométhane. Les plus grandes valeurs des concentrations et rendements ont été enregistrées pour le système solvant 5 :5 V/V qui sont égales à 64,48 g/l et 6,43 m/m. Les fractions d'éther de pétrole se classent en dernier avec des concentrations et rendement égales à 4,26 g/l et 0,43% m/m pour le système solvant 7 :3 V/V et 28,34 g/l et 2,82 % m/m pour le système 4 :6 V/V.

Dans le cas de l'utilisation de l'eau et le méthanol à 100%, nous avons remarqué que les concentrations et les rendements pour l'aqueux sont supérieurs (162,84g/l et 16.23% m/m) à ceux de méthanol (134,29g/l et 13,39% m/m). Une remarque qui attire l'intention est que la concentration et le rendement dans les deux extraits augmentent avec la diminution de l'indice de polarité (9,1 pour l'eau et 5,1 pour le méthanol), ce qui indique que les fruits de Pistachier de l'atlas renferment des composés polaires extractibles plus par le méthanol que de l'eau.

Par contre, il n'y pas une tendance des variations des concentrations et des rendements en fonction de l'indice de polarité des solvants d'extraction à l'exception des extraits aqueux des systèmes 8 :2 ; 7 :3 et 6 :4 où la concentration et le rendement diminuent régulièrement avec l'augmentation de l'indice de polarité et qui donne une bonne corrélation négative de coefficient -0,93. Les valeurs des indices de polarité sont calculées par la relation suivante :

$$\mathbf{I.P(MEOH) \% X (Meoh) + I.P (Eau) \% X (Eau).}$$

Tableau 07 : Concentrations et Rendements des extraits.

Solvant V : V et indice de polarité	E. P		DCM		A. E		Eau	
	[C] g/l	R %	[C] g/l	R %	[C] g/l	R %	[C] g/l	R %
8 :2 (5,88)	13,84	1,37	72,09	7,18	19,26	1,92	882,89	82,35
7 :3 (6,627)	4,26	0,43	12,46	1,24	9,12	0,90	117,59	11,71
6 :4 (6,66)	8,26	0,82	40,28	4,02	17	1,69	106,29	10,62
5 :5 (7,05)	9,97	0,99	65,77	6,55	64,48	6,42	740,83	73,86
4 :6 (7,44)	28,34	2,82	84,97	8,46	77,7	7,74	107,12	10,67

Eau 100% (9,1)	MeOH 100% (5,1)
162,84 g/l	134,29 g/l
16.23%	13,39%

*Les valeurs entre parenthèses sont les indices de polarité des solvants.

III.2. Dosage des composés phénoliques :

À partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure 05), nous avons calculé le contenu de différentes fractions en composés phénoliques. Les valeurs sont exprimées en gramme équivalent en acide gallique dans 100 g de fruits de Pistachier de l'Atlas (g/100g EAG). Les résultats sont consignés dans le tableau 08. D'après les résultats des deux tableaux 7 et 8, nous remarquons que les rendements et les concentrations des extraits sont supérieurs à ceux des concentrations et quantités des composés phénoliques, ce qui montre que les extraits méthanoliques et aqueux contiennent d'autres composés que les phénols et qui sont extractibles par les systèmes des solvants utilisés dans notre démarche expérimentale. Par exemple pour la fraction éther de pétrole du système 8 :2 V/V, la concentration du résidu sec est 13,84 g/l par contre pour les composés phénoliques elle est égale à 0,046 g/l c'est-à-dire un rapport de 300 fois.

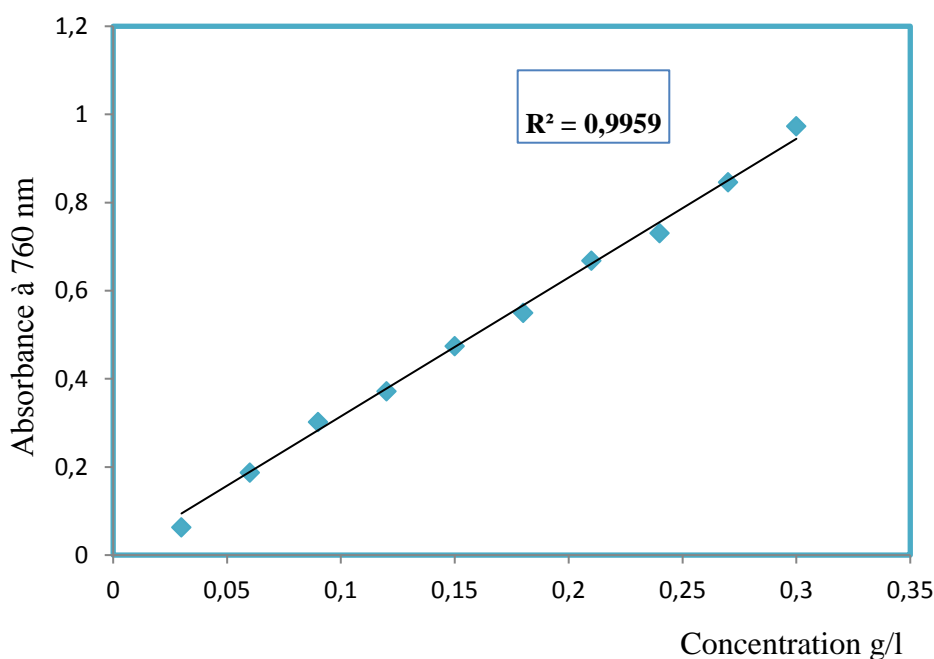


Figure 05 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

A la lumière des résultats présentés dans le tableau 8, nous remarquons que les faibles quantités des composés phénoliques sont enregistrées dans les fractions éther de pétrole pour les systèmes 8 :2 et 6 :4, la fraction acétate d'éthyle dans le système 7 :3 et les fractions d'eau distillée dans les systèmes 8 :2 et 5 :5 les valeurs sont respectivement 4,62, 6,02, 3,86, 6,68 et 7,88 mg/100g EAG. Les fractions dichlorométhane (5 :5), acétate d'éthyle (6 :4 et 5 :5 et 4 :6) et eau distillée (6 :4 et 4 :6), ont montré un contenu important en composés phénoliques qui dépasse 100mg/100g. La

plus grande valeur est enregistrée dans la fraction acétate d'éthyle 5 :5 avec une quantité 1680,47 mg/100g EAG, par contre la fraction dichlorométhane du système 5 :5 a enregistré la petite valeur qui est 145,33 mg/100g EAG.

Dans les extraits eau distillée et méthanol, les quantités en composés phénoliques sont respectivement 21,46 et 18,11 mg/100g EAG. Il est clair que l'eau est le solvant le plus adéquat à extraire ces composés contenus dans les fruits du Pistachier de l'Atlas

Tableau 08 : Concentrations et quantités des composés phénoliques dans les extraits.

Systèmes de solvant	E. P		DCM		A. E		Eau	
	[C]	Q	[C]	Q	[C]	Q	[C]	Q
	g/l	mg/100g	g/l	mg/100g	g/l	mg/100g	g/l	mg/100g
8 :2	0,046	4,62	0,18	18,17	0.104	10,44	0.067	6,68
7 :3	0.187	18,74	-	22,70	0.038	3,86	0.12	12,82
6 :4	0.060	6,02	0.25	24,94	4.79	479,15	6.44	644,16
5 :5	0.263	26,28	1.45	145,33	16.13	1680,47	0.079	7,88
4 :6	-	-	0.177	17,65	0.082	828,64	5.28	526,90

Eau 100% (9,1)	MeOH 100% (5,1)
0.21g/l	0.18mg/100g
21,46g/l	18,11mg/100g

Si on traite tous les résultats ensemble, aucune corrélation n'a été remarquée entre l'indice de polarité des solvants et les quantités en composés phénoliques. Mais si on les traite par groupe, nous avons trouvé l'existence de quelques corrélations positives entre l'indice de polarité et la quantité en composés phénoliques. La meilleure corrélation a été trouvée dans la fraction acétate d'éthyle des systèmes 8 :2 ; 6 :4 et 5 :5, avec un coefficient de corrélation égal à 0,90, suivi par la fraction eau dans les systèmes 8 :2, 7 :3 et 6 :4 dont le coefficient de corrélation est de 0,87, la fraction dichlorométhane pour les systèmes 8 :2 ; 7 :3 ; 6 :4 et 5 :5 a enregistré le plus petit

coefficient de corrélation qui est égal 0,80. Ces résultats montrent que l'augmentation du pourcentage de l'eau dans les solvants contribue à la capacité en composés phénoliques.

III.3. Evaluation de l'activité anti-urolithiasique des extraits :

Avant de tester l'effet anti-urolithiasique de nos extraits nous avons tout d'abord déterminé la cinétique de la réaction de la cristallisation oxalocalcique qui se produit entre le chlorure de calcium CaCl_2 et l'oxalate de sodium $\text{C}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ en présence et en absence des extraits inhibiteurs.

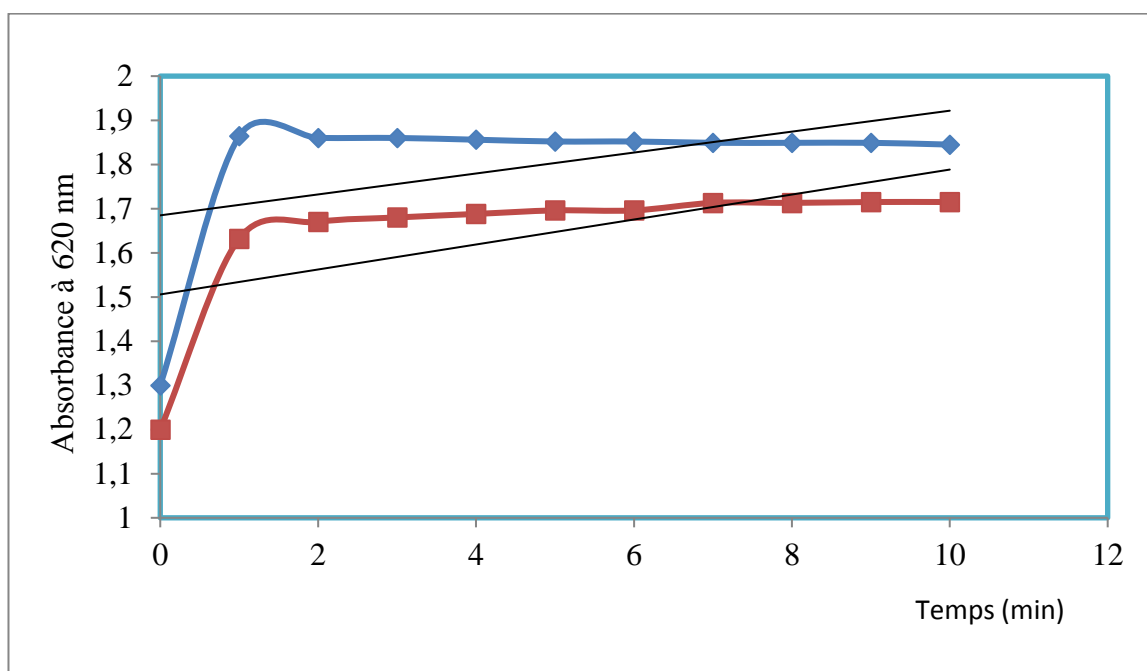


Figure 06 : Courbe cinétique de la réaction de la cristallisation oxalocalcique.

Cette cinétique a été suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde 620 nm pendant 10 mn. La cinétique a été réalisée pour la majorité des extraits. La figure 06 montre l'évolution de l'absorbance A en fonction du temps t (mn) de la fraction acétate d'éthyle du système 8 :2. D'après cette courbe, on observe qu'à partir de 5 mn de réaction l'absorbance ne varie plus (un plateau qui se forme) et que l'absorbance diminue en présence de l'extrait ce qui indique que ce dernier inhibe la réaction cristallisation oxalocalcique et par conséquent l'extrait a un effet anti-urolithiasique. En se basant sur ce résultat, nous avons réalisé toutes nos expériences à 5 mn.

Le pouvoir anti-urolithiasique des extraits a été déterminé par le calcul du pourcentage d'inhibition $\text{PI}\% = (\text{A}_0 - \text{A}_i) / \text{A}_i \times 100$, avec A_0 est l'absorbance mesurée en absence de l'inhibiteur et A_i est l'absorbance mesurée en présence de l'inhibiteur.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 9. A la lumière de ces résultats, on peut dire que la plupart des extraits inhibent la réaction de la cristallisation oxalocalcique à l'exception de l'extrait

méthanolique, par contre l'extrait aqueux a enregistré un pourcentage d'inhibition égal 93,57%. Les meilleurs inhibiteurs de la réaction de la cristallisation oxalocalcique sont ceux des fractions aqueuses dans tous les systèmes de solvants utilisés, à titre d'exemple la fraction aqueuse du système 4 :6 à montrer la plus grande valeur du pourcentage d'inhibition (98,59%). Les fractions dichlorométhane se classent en deuxième position comme inhibiteurs suivie par les fractions acétate d'éthyle, les plus faibles valeurs des pourcentages d'inhibition sont enregistrées chez les fractions éthers de pétrole. Une remarque importante à retirer est que le pourcentage d'inhibition de la réaction de la cristallisation oxalocalcique augmente avec l'indice de polarité c'est-à-dire il augmente avec l'ajout de l'eau dans le solvant d'extraction. Des bonnes corrélations positives ont été trouvées entre les pourcentages d'inhibition et les indices de polarité des solvants à savoir : 0,93 dans les fractions eau et 0,88 dans les fractions acétate d'éthyle pour tous les systèmes de solvant utilisés.

Afin de tester l'efficacité de nos extraits vis-à-vis de l'inhibition de la réaction de cristallisation oxalocalcique, nous avons comparé l'efficacité de nos extraits par rapport à un médicament commercial (Pharbiol) utilisé pour le traitement des calculs urinaires. Pour ce faire, nous avons testé l'effet de ce médicament sur la réaction de cristallisation oxalocalcique dans les mêmes conditions de celles de nos extraits. Après avoir s'assurer que ce médicament a un effet positif sur la dite réaction, nous avons tracé une courbe d'étalonnage du pourcentage d'inhibition I% en fonction des concentrations mM (solutions aqueuses) (figure 07).

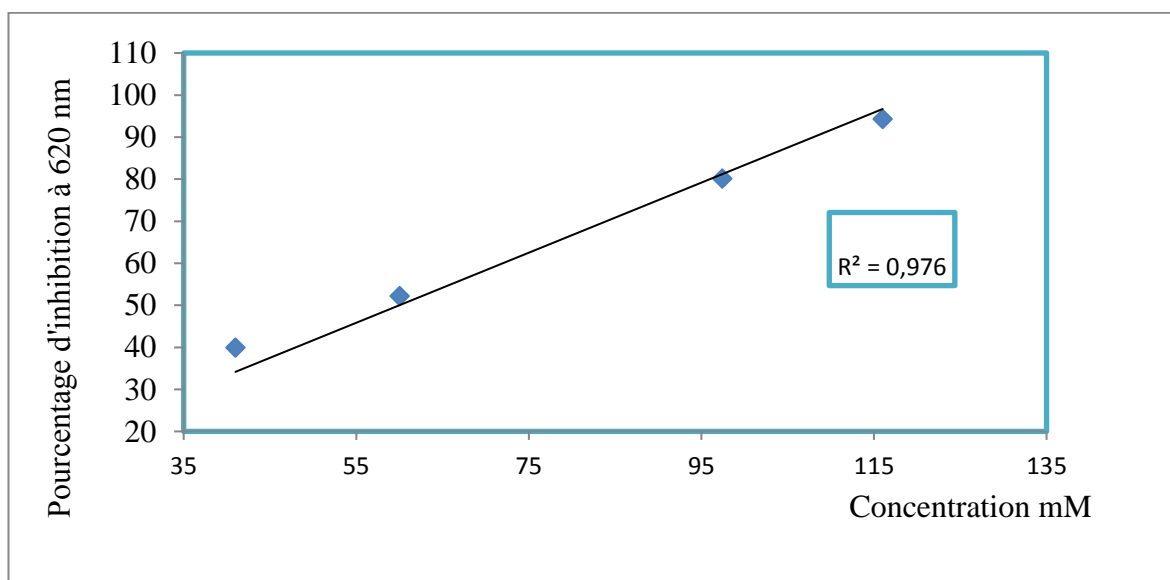


Figure 07 : Courbe d'étalonnage du pourcentage d'inhibition % du médicament pharbiol en fonction de concentration en mM.

En définissant un facteur pour déterminer la capacité des extraits à inhiber la réaction de cristallisation oxalocalcique par rapport au médicament. On désigne par PECAL qui signifie « la concentration en mM d'une solution de pharbiol possédant la même capacité inhibitrice anti-urolithiasique équivalente à une solution 1mM de l'extrait étudié. En utilisant la courbe d'étalonnage de la pharbiol, nous avons calculé les valeurs de PECAL, les résultats sont mentionnés dans le tableau 9. D'après les résultats, on remarque que toutes les fractions de tous les systèmes de solvants possèdent des capacités inhibitrices vis-à-vis de la réaction de cristallisation oxalocalcique supérieures aux médicaments, car la majorité des valeurs de PECAL sont supérieures à 1. L'extrait aqueux des fruits de Pistachier de l'Atlas a montré une capacité inhibitrice très importante par rapport au médicament utilisé pour les calculs rénaux, sa capacité est 14779 fois supérieure.

Tableau 9 : Pourcentage d'inhibition des calculs rénaux.

Système de solvant V/V	E. P		DCM		A. E		Eau	
	[C]	I	[C]	I	[C]	I	[C]	I
	mM	%	mM	%	mM	%	mM	%
8 :2	-	-	12,01	7,61	13,22	8.42	24,62	15,6
7 :3	25,63	16,27	91,13	57 ,74	33,91	21,48	9,08	5,8
6 :4	13,52	9,18	30,17	19,16	27,85	17,65	60,96	38,63
5 :5	37,04	23,51	55,81	35,36	41,48	26,29	143,72	91,05
4 :6	21,09	13,40	78,92	49,99	82,55	52,315	155,63	98,59

Eau 100% (9,1)	MeOH 100% (5,1)
14779,06mM	-
193.57%	-

La cristallisation oxalocalcique se produit par la réaction des ions Ca^{2+} et les ions de $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ pour former le composé CaC_2O_4 qui est responsable de la formation des calculs rénaux.



Notre but dans ce travail est d'inhiber la formation de CaC_2O_4 par les différents extraits des fruits de Pistachier de l'Atlas. Cette inhibition peut être réalisée en captant les ions Ca^{2+} du milieu réactionnel par la réalisation de la réaction de cet ion avec d'autres composés plus solubles dans le milieu réactionnel. Parmi les réactions possibles on peut citer celles qui conduisent à des composés formant des liaisons chimiques de type coordination pour former des composés complexes plus solubles. Les inhibiteurs capables de former ce type de réactions sont ceux qui possèdent dans leurs structures chimiques des atomes donneurs d'électrons comme l'oxygène, le soufre et l'azote. Les composés chimiques organiques qui renferment dans leurs structures les atomes d'oxygène, de soufre et de l'azote sont : les acides gras, les triglycérides, les stérols, les tocophérols, les composés phénoliques, les saponines, les terpènes et les protéines.

Une recherche bibliographique sur la photochimie du fruit de Pistachier de l'atlas nous a fournie des informations importantes sur le contenu du fruit en ces composés.

Les fruits de Pistachier de l'Atlas contiennent des acides gras, les triglycérides, les stérols, les composés phénoliques, les tanins, les terpènes, les carbohydrates et les saponines qui possèdent des capacités à inhiber la cristallisation d'oxalate de calcium car ces composés possèdent dans leurs structures des atomes riches en doublets libres d'électrons. L'extrait de pistachier de l'atlas contient aussi des protéines (fonction amines et acides), la fonction carboxylique des acides aminés attire les ions de calcium par les paires électrons qui existent dans les groupements d'acides aminés (Guenane, Bombarda et al. 2015), (Yousfi, Nedjmi et al. 2002), (Yousfi Hamia 2009, Gourine 2010, Belyagoub /16/17).

L'inhibition d'oxalate de calcium en présence des extraits de pistachier de l'atlas est probablement due à la formation des liaisons de coordination entre les ions de calcium et les constituants de l'extrait tels les composés cités précédemment, ces composés forment des complexes solubles. Dans notre travail, nous avons utilisé des systèmes de solvants polaires et par conséquent l'existence des acides gras et des triglycérides dans les fractions obtenues est à éliminer.

III.4. Modèle gravimétrique :

A partir de la relation ci-dessous, nous avons calculé le pourcentage de dissolution des calculs.

$$D \% = ((m_0 - m_f) / m_0) \times 100$$

Les valeurs de ce pourcentage sont égales à 1,38 % pour la fraction aqueuse et 11,43% pour la fraction acétate d'éthyle pour le système 4 :6. Si nous comparons ces résultats avec ceux des

tableaux 7 et 9 où nous constatons que les fractions aqueuses et acétate d'éthyle ont montré des taux d'inhibition de la réaction oxalocalcique d'ordre 98,59% et 52,31% respectivement, ce qui est tout-à-fait inversé par rapport au modèle gravimétrique. Nous pouvons justifier ce fait par deux propositions, le premier est que les deux méthodes turbidimétrie et la gravimétrie n'ont pas le même principe d'action (dans la turbidimétrie les ions Ca^{2+} sont complexés avec l'inhibiteur, par contre dans la gravimétrie l'inhibiteur dissocie les calculs), le deuxième est que les deux fractions ne contiennent pas les molécules responsables à l'inhibition ainsi qu'à la dissolution.

Pour confirmer ces constatations, une analyse chromatographique est nécessaire pour identifier et caractériser les molécules responsables à l'inhibition des calculs.

III.5. Etude de l'effet inhibiteur de l'alpha amylase :

Le pourcentage du pouvoir inhibiteur de nos extraits vis-à-vis de l'alpha-amylase a été calculé par la relation suivante :

Afin de déterminer l'efficacité de nos extraits contre l'inhibition de l'alpha-amylase, nous avons étudié l'effet de médicament (Gluconova) à base d'acarbose utilisé comme traitement pour le diabète. Pour se faire, nous avons tracé une courbe d'étalonnage du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration mM du médicament (figure 08).

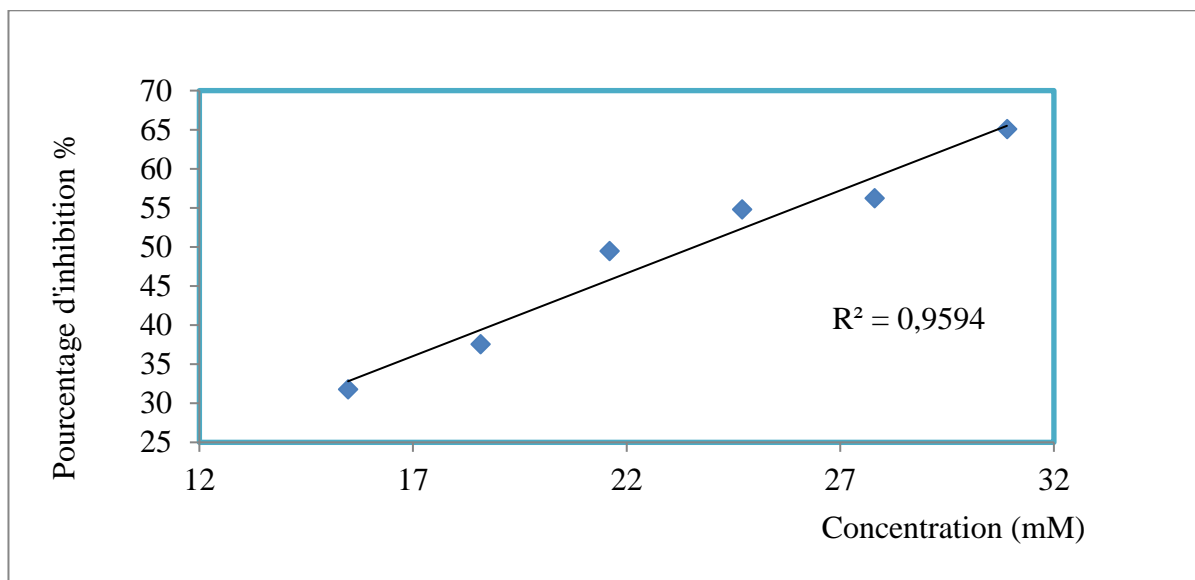


Figure 08 : Courbe d'étalonnage du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration du médicament en mM.

A l'aide de cette courbe d'étalonnage, nous avons calculé les valeurs d'AEIC. AEIC signifie ' la concentration en mM d'une solution du médicament possédant la même capacité inhibitrice

équivalente à une solution de concentration d'1mM de l'extrait étudié'. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 10.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 10. En se basant sur ces résultats, on peut dire que tous les extraits inhibent l'alpha-amylase. Les meilleurs inhibiteurs sont enregistrés dans les fractions aqueuses, acétate d'éthyle dans tous les systèmes de solvants utilisés suivi par les fractions dichlorométhane et en fin les fractions éther de pétrole. La plus grande valeur du pourcentage d'inhibition est trouvée dans la fraction aqueuse et acétate d'éthyle pour le système 4 :6 dont les valeurs sont égales à 73,87%, 72,91% respectivement, la plus faible valeur du pourcentage d'inhibition est enregistré dans la fraction éther de pétrole dans le système 8 :2 avec une valeur de 18,15%. Une remarque importante générale à retirer pour les systèmes 8 :2 ; 7 :3 et 6 :4 est que le pourcentage d'inhibition de l'enzyme augmente avec l'indice de polarité c'est-à-dire il augmente avec l'ajout de l'eau dans le solvant d'extraction. Des bonnes corrélations positives ont été trouvées entre les pourcentages d'inhibition et les indices de polarité des solvants à savoir : 1 dans les fractions d'acétate d'éthyle, 0,85 dans les fractions de dichlorométhane et 0,97 dans les fractions de l'éther de pétrole pour tous les systèmes de solvant utilisés.

Les valeurs d'AEIC nous ont permis de classer l'efficacité de nos extraits à inhiber l'alpha-amylase par rapport au médicament utilisé contre le diabète. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 10. Ces résultats montrent que tous les extraits sont plus efficaces que le médicament. Les valeurs d'AEIC s'échelonnent entre 6,93 mM dans la fraction éther de pétrole du système 8/2 et 34,10 mM dans la fraction acétate d'éthyle dans le système 4 :6.

Beaucoup de travaux de recherche photochimiques ont été réalisés sur Pistachier de l'Atlas (fruits). Ces travaux ont montré que le fruit est une source importante de molécules bioactives qui possèdent des activités antioxydants et biologiques certaines. Comme α - tocophérol γ -tocophérol et β -sitostérol et les composés phénoliques.

Tableau 10 : pourcentage d'inhibition d'alpha amylase.

Système de solvant V/V	E. P		DCM		A. E	
	[C] mM	I %	[C] mM	I %	[C] mM	I %
8 :2	8,48	18,15	12,48	26,68	22,70	48 ,54
7 :3	12,67	27,08	25,24	53,96	30,21	64,58
6 :4	23,34	49,90	24,87	53,17	32,48	69,44
5 :5	10,71	22,91	11,69	25	31,38	66,26
4 :6	11,09	23,71	19,53	41,76	34,10	72,91

Eau 100%	34,55 mM / 73,87 %
-----------------	--------------------

Nous avons essayé de trouver des relations de corrélation entre l'effet anti-urolithiasique et l'effet anti-enzymatique. Une bonne corrélation positive a été trouvée entre les fractions acétate d'éthyle avec un coefficient de corrélation de l'ordre 0,74, les fractions dichlorométhane ont enregistrées une faible corrélation dont le coefficient de corrélation est égal à 0,43, par contre une bonne corrélation négatives a été remarquée pour les fractions éther de pétrole d'un coefficient de corrélation -0,76. Ces valeurs indiquent que 74% des fractions d'acétate d'acétate d'éthyle et 43 % des fractions dichlorométhane inhibent la réaction de la cristallisation d'oxalocalcique et l'alpha-amylase en même temps. Par contre pour les fractions d'éther de pétrole la valeur négative du coefficient de corrélation indique que les meilleures fractions inhibitrices de l'alpha-amylase sont des mauvais inhibiteurs pour la réaction de la cristallisation d'oxalocalcique et vice versa.

Plusieurs études ont été entreprises sur l'effet des extraits des plantes médicinales (voir tableau 05) sur l'inhibition de l'alpha-amylase, enzyme en relation avec le diabète, ces études montrent que les molécules ayant la capacité à inhiber cette enzyme sont : les flavonoides, les terpènes, les alcaloïdes, les composés sulfuriques, les tanins et phytostérols. L'inhibition importante des extraits des fruits de Pistachier de l'atlas et notamment les fractions acétate d'éthyle est due à la présence

de ce type de composés dans les fruits.(Yousfi, Djeridane et al. 2009),(Yousfi, Nedjmi et al. 2002) ;(Gourine, Yousfi et al. 2010),(Bozorgi, Memariani et al. 2013).

Conclusion

Générale

L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet des extraits polaires des fruits de Pistachier de l'Atlas sur l'inhibition de la réaction de la cristallisation oxalocalcique responsable à la formation des calculs rénaux et l'inhibition de l'alpha –amylase, enzyme en relation directe avec la maladie le diabète.

Le présent travail nous a permis de doser les composés phénoliques dans plusieurs fractions organiques issus de différents systèmes de solvants méthanolique et eau et d'étudier l'effet de ces extraits sur l'inhibition sur la réaction de la cristallisation oxalocalcique et l'alpha-amylase et de trouver des relations de corrélation entre les résultats.

Les résultats obtenus montrent que les quantités des résidus des extraits sont très supérieures à celles des composés phénoliques calculées par spectrophotométrie et que ces quantités dépendent des systèmes de solvants. Ce qui prouve que les extraits bruts ne contiennent pas que les composés phénoliques.

Généralement les meilleures valeurs en quantités des composés phénoliques ont été trouvées dans les fractions acétate d'éthyle (1680,47 mg/100 EAG), par les plus quantités en ces composés ont été enregistrées dans les fractions éther de pétrole (4,62 mg/100 EAG).

La quantité en composés phénoliques varie dans le même sens que l'indice de polarité dans les systèmes de solvants 8 :2 ; 6 :4 et 5 :5, dont le coefficient de corrélation est 0,90.

La majorité des extraits possèdent la capacité à inhiber la réaction de la cristallisation oxalocalcique. Les meilleurs inhibiteurs sont l'extrait aqueux avec un pourcentage d'inhibition de 93,57 % suivi par la fraction aqueuse dans le système 4 :6 avec un pourcentage d'inhibition 98,59%. Ces deux extraits ont montré des capacités à inhiber la réaction de la cristallisation oxalocalcique de l'ordre de 1464 et 15 fois plus efficace que Pharbiol médicament commercial utilisé dans le traitement des calculs rénaux.

L'augmentation de la proportion de l'eau dans solvant (augmentation de la polarité) augmente l'inhibition de la réaction de la cristallisation oxalocalcique.

Toutes les fractions de tous les systèmes de solvants utilisés inhibent l'alpha- amylase. La fraction acétate d'éthyle dans le système 4 :6 à enregistrée la meilleure valeur du pourcentage d'inhibition (72,91%), tandis que la fraction éther de pétrole pour le système 8 :2 a montré la valeur la plus faible du pourcentage d'inhibition (18,15%). Ces deux fractions sont respectivement 22 et 5 fois plus efficaces que le médicament utilisé pour le traitement du diabète.

La capacité inhibitrice des extraits augmente avec l'indice de polarité.

Des corrélations ont été enregistrées entre l'effet antiuroolithiasique et l'inhibition de l'alpha-amylase. Les corrélations sont observées pour les fractions acétate d'éthyle et dichlorométhane avec des coefficients de corrélation de l'ordre 0,74 et 0,43 respectivement.

Les résultats obtenus sont très intéressants et très encourageants et justifient l'utilisation traditionnelle des fruits de Pistachier de l'atlas par la population locale dans les traitements des maladies du diabète et les calculs rénaux et que les fractions aqueuses sont les efficaces.

En perspective, il reste de faire une étude similaire sur les autres organes de l'arbre tels que, les feuilles, les gales et champignon (hinotitus). D'analyser toutes les fractions par la combinaison des méthodes chromatographiques et spectroscopiques afin de caractériser et identifier les composés contenus dans les fractions et d'étudier les mécanismes d'action dans les milieux réactionnelles et déduire la relation structure-activité.

Références

Bibliographiques

Amar, A., D. Harrache. "Effet de *Parietaria officinalis* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium, dans l'urine." Phytothérapie **8**(6): 342-347.

Atmani, F. and S. Khan (2000). "Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro." Bju International **85**(6): 621-625.

August, K. (1974). "Effect on alloxan diabetes of allyl propyl disulphide obtained from onion." Naturwissenschaften **61**(4): 172-173.

Barrero, A., M. Herrador, et al. (2005). "Chemical composition of the essential oils of *Pistacia atlantica* Desf." Journal of Essential Oil Research **17**(1): 52-54.

Ben Ahmed, Z., M. Yousfi, et al. (2017). "Seasonal, gender and regional variations in total phenolic, flavonoid, and condensed tannins contents and in antioxidant properties from *Pistacia atlantica* ssp. leaves." Pharmaceutical biology **55**(1): 1185-1194.

BENSAFIEDDINE.F(2015). Etude de l'effet antiurolithiasique in vitro des extraits de trois plantes médicinales locales. Mémoire de maste. université Ammar thelidji Laghouat(Algeria).

Boizot, N. and J.-P. Charpentier (2006). "Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier." Le Cahier des Techniques de l'INRA, In: Numéro spécial: 79-82.

Boutaghane, N., A. Nacer. (2004). "Comparative antibacterial activities of the essential oils of stems and seeds of *Pituranthos scoparius* from Algerian septentrional Sahara." Chemistry of Natural Compounds **40**(6): 606-607.

Chung, I.-W., N. A. Moore, et al. (2002). "Behavioural pharmacology of polygalasaponins indicates potential antipsychotic efficacy." Pharmacology Biochemistry and Behavior **71**(1-2): 191-195.

Delazar, A., R. Reid, et al. (2004). "GC-MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *mutica*." Chemistry of Natural Compounds **40**(1): 24-27.

Giocanti, N., C. Hennequin, et al. (1993). "DNA repair and cell cycle interactions in radiation sensitization by the topoisomerase II poison etoposide." Cancer research **53**(9): 2105-2111.

Gourine, N., M. Yousfi, et al. (2010). "Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria." Industrial Crops and Products **31**(2): 203-208.

Guenane, H., I. Bombarda, et al. (2015). "Effect of maturation degree on composition of fatty acids and tocopherols of fruit oil from *Pistacia atlantica* growing wild in Algeria." Natural product communications **10**(10): 1934578X1501001023.

Hii, C. and S. Howell (1985). "Effects of flavonoids on insulin secretion and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ handling in rat islets of Langerhans." Journal of Endocrinology **107**(1): 1-8.

Ishikawa, T. o. and H. R. Herschman (2007). "Two inducible, functional cyclooxygenase-2 genes are present in the rainbow trout genome." Journal of cellular biochemistry **102**(6): 1486-1492.

Juyal, D., G. Bisht, et al. (2010). "Antilithiatic Effect of Ethanolic Extract of *Stevia Rebaudiana* Bert." Pharmacologyonline **2**: 517-523.

Kawashty, S., S. Mosharrafa, et al. (2000). "The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt." Biochemical Systematics and Ecology **28**(9): 915-917.

Khajavi Rad, A., M.-A.-R. Hajzadeh, et al. (2011). Preventive effect of *Cynodon dactylon* against ethylene glycol-induced nephrolithiasis in male rats. Avicenna Journal of Phytomedicine. **1**: 14-23.

Khan, Z. A., A. M. Assiri, et al. (2001). "Inhibition of oxalate nephrolithiasis with *Ammi visnaga* (AI-Khillah)." International urology and nephrology **33**(4): 605-608.

Lebovitz, H. (1997). "Insulin allergy and insulin resistance." Current therapy in endocrinology and metabolism **6**: 500-504.

Motomura, K., H. Fukuzawa, et al. (2009). "Multiple ionization of atomic argon irradiated by EUV free-electron laser pulses at 62 nm: evidence of sequential electron strip." Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics **42**(22): 221003.

Patel, V. and Y.-R. Kim (2007). "Contribution of low-and middle-income countries to research published in leading general psychiatry journals, 2002–2004." The British Journal of Psychiatry **190**(1): 77-78.

Roitman, J. N., G. B. Merrill, et al. (2011). "Survey of ex situ fruit and leaf volatiles from several *Pistacia* cultivars grown in California." Journal of the Science of Food and Agriculture **91**(5): 934-942.

Rowell, P., M. Sampaio, et al. (1979). "Alteration of cyanobacterial glutamine synthetase activity in vivo in response to light and NH₄⁺." Archives of microbiology **120**(3): 195-200.

Shahouzehi, B., G. Sepehri, et al. (2018). "Effect of Pistacia Atlantica Resin Oil on Anti-Oxidant, Hydroxyprolin and VEGF Changes in Experimentally-Induced Skin Burn in Rat." World journal of plastic surgery **7**(3): 357.

Sheehan, E., M. Zemaitis, et al. (1983). "A constituent of Pterocarpus marsupium,(-)-epicatechin, as a potential antidiabetic agent." Journal of natural products **46**(2): 232-234.

Tzakou, O., I. Bazos, et al. (2007). "Volatile metabolites of Pistacia atlantica Desf. from Greece." Flavour and fragrance journal **22**(5): 358-362.

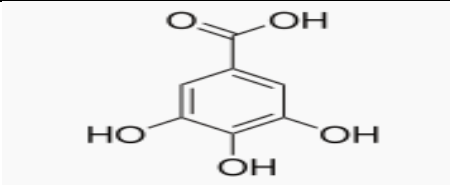
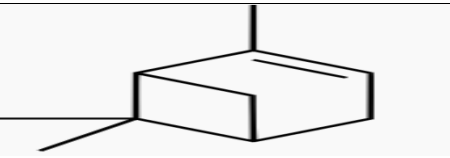
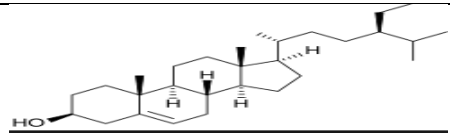
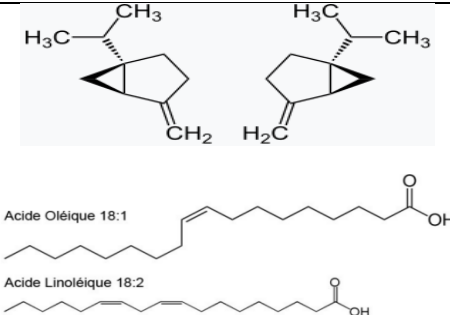
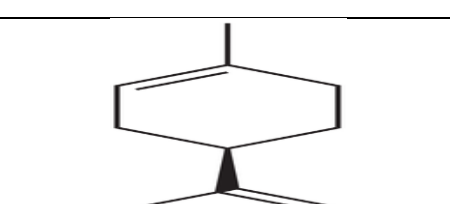
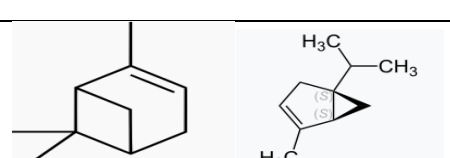
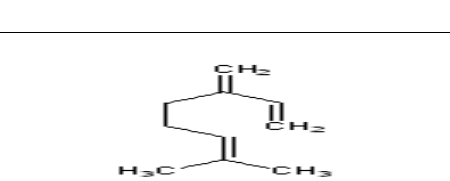
Viel, T. A., C. D. Domingos, et al. (1999). "Evaluation of the antiurolithiatic activity of the extract of Costus spiralis Roscoe in rats." Journal of ethnopharmacology **66**(2): 193-198.

Yousfi, M., A. Djeridane, et al. (2009). "Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of Pistacia atlantica." Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives **23**(9): 1237-1242.

Yousfi, M., B. Nedjmi, et al. (2002). "Fatty acids and sterols of Pistacia atlantica fruit oil." Journal of the American Oil Chemists' Society **79**(10): 1049-1050.

Annexes

Tableau 01 : Travaux intérieur sur le *pistacia atlantica*.

Parties de plantes	Composé chimique	Structure	Références
Galle et feuilles	Acide gallique		(Bozorgi, Memariani et al. 2013) / (Yousfi, Djeridane et al. 2009).
Résine	β -pinène		(Delazar, Reid et al. 2004)/(Bozorgi, Memariani et al. 2013).
Fruit	β -sitostérol		(Yousfi, Nedjmi et al. 2002).
Fruits, fruits immatures	Sabinene Acide oléique et linoléique		(Bozorgi, Memariani et al. 2013) / (Tzakou, Bazos et al. 2007) / (Roitman, Merrill et al. 2011).
Feuilles mâles	Mono-terpènes huiles essentielles		(Gourine, Yousfi et al. 2010).
Feuilles	α -Pinène + α - Thujene		(Gourine, Yousfi et al. 2010).
Résine, fruits	β -myrcene		(Bozorgi, Memariani et al. 2013). (Barrero, Herrador et al. 2005).

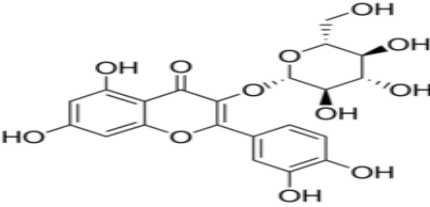
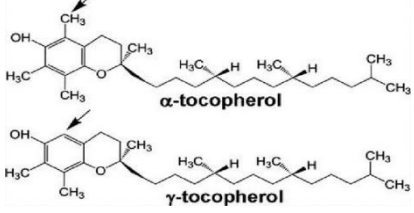
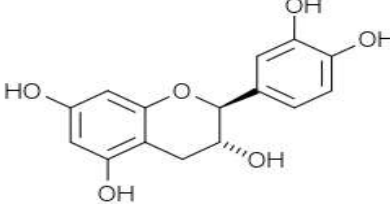
Parties aériennes	3-O-glucopyranoside de quercétine		(Bozorgi, Memariani et al. 2013). (Kawashty, Mosharrafa et al. 2000).
Fruits	α -tocophérol γ -tocophérol		(Guenane, Bombarda et al. 2015).
Fruits Feuilles et galles	Polyphénols (Flavonoïdes 95% acide benzoïque 92%)		(Yousfi, Djeridane et al. 2009).

Tableau 02 : Classement des inhibiteurs.

Classement des inhibiteurs	Molécules
Les inhibiteurs micros moléculaires	Les métaux (Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , Mg^{2+}), Citrate (acide citrique) et iso citrate Acides aminé (aspartique, glutamiques) Tartrate (polyacides carboxylique)
Les inhibiteurs macromoléculaires	Les glycoprotéines et Les acides Ribonucléique ARN
Les inhibiteurs de la germination cristalline	Le magnésium (Mg), Le zinc (Zn), L'aluminium, le citrate
Les inhibiteurs de la croissance cristalline	Pyrophosphates, les tartrates, l'aspartate et le glutamate
les inhibiteurs de l'agrégation cristalline	Les ARN (Acide ribonucléique), la protéine de Tamm- Horsfall THF

Tableau 03 : Plantes étudiées dans un système in vitro.

Plante	Famille	Partie utilisée	Type d'extrait	Référence
Herniaria fontanesii (Fetat el Hdjar)	Caryophyllaceae	Partie aérienne et Racines	Méthanol/eau	(Atmani and Khan 2000)
Pithuranthos Scoparius (Guezah)	Apiaceae	Partie aérienne et Racines	Méthanol/eau	(Boutaghane, Nacer et al. 2004)
Cyndon dactylon (L). (Enedjem)	Poaceae	Partie aérienne et Racines	Méthanol/eau	(Khajavi Rad, Hajzadeh et al. 2011) (Mohamed, Khedidja et al. 2014/2015)
Citronnier	Rutaceae	Fruits	Jus de fruits	(Khan, Assiri et al. 2001)
Ammi visnaga L	Apiaceae	Fruits	Aqueux	(Viel, Domingos et al. 1999)

Tableau 04 : Quelques médicaments anti diabétique actuellement commercialisés.

Famille du médicament	Nom générique (Nom commerciale)	Mode d'action
Biguanides	Metformine (glucophage®) Metformine à libération Prolongée (glumetza®)	Diminution de la production hépatique de glucose
Sulfamides hypoglycémiants	Gliclazide (diamicron®) Gliclazide (diamicron® mr) Glimépiride (amaryl®) Glyburide (diaβeta®)	Stimulation de la sécrétion résiduelle d'insuline par un mécanisme bien identifié en se liant à un récepteur des sulfamide sur la cellule β.
Inhibiteurs des α glucosidases	Acarbose (glucobay®)	Ralentissement de la digestion des glucides dans l'intestin. Le glucose passe plus lentement dans le sang.
Glitazones ou thiazolinediones	Pioglitazone (actos®) Rosiglitazone (avandia®)	Amélioration de la sensibilité à l'insuline, au niveau du foie, du muscle et du tissu adipeux.
Gliptines (inhibiteur de dpp iv)	Sitagliptine (januvia) Vilagliptine (galvus)	Augmentation du taux du GLP1 en bloquant sa dégradation
Agoniste du glp1	Exénatide (byetta®) exénatide à libération prolongée (bydureon®)	Potentialisation de l'insulinosécrétion provoqué par l'hyperglycémie et freinage de la sécrétion de glucagon

Tableau 05 : Mode d'actions de quelques plantes antidiabétiques utilisées dans le monde.

Nom scientifique	Principe actif isolé	Classe chimique	Mécanisme d'action	Références
Pterocarpus marsupium (Fabacées)	Epicathéchine	Flavonoïdes	Induit la régénération des cellules β et la sécrétion d'insuline	(Sheehan, Zemaitis et al. 1983) (Patel and Kim 2007)
Bauhinia purpurea (légumineuse)	Quercétine		Potentialise la sécrétion d'insuline au niveau des cellules β pancréatiques	(Hii and Howell 1985)
Nerium oleander L.(Apocinacée)	Quercétine et catéchine		Inhibition alpha-glucosidase	(Ishikawa and Herschman 2007)
Galega officinalis L.(Fabacées)	Galéagine	Alcaloïdes	30mg/kg de gaaléagine provoquent chez les rats diabétiques une action hypoglycémiant	(BENNACER)
Coffea arabica (rubiacees)	B-sitostérol	Stéroïdes et triterponoides	Activité hypoglycémiant	(Rowell, Sampaio et al. 1979)
Panax ginseng (araliacées)	Ginsenside			(Chung, Moore et al. 2002)
Allium cepa (liliacées)	Allyl propyle disulfide Diallyl disulfide oxide	Composés sulfurés	Effet hypoglycémiant chez des rats rendus diabétiques et des patients ayant un diabète de type 2	(August 1974)

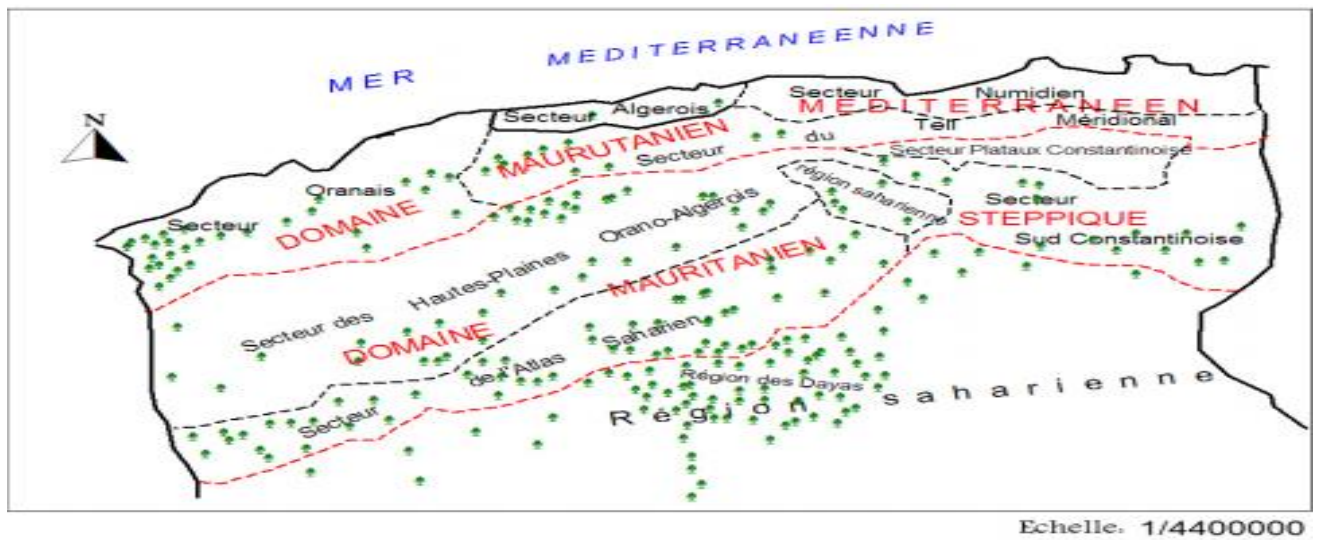


Figure 01 : Distribution de *Pistacia atlantica* en Algérie.

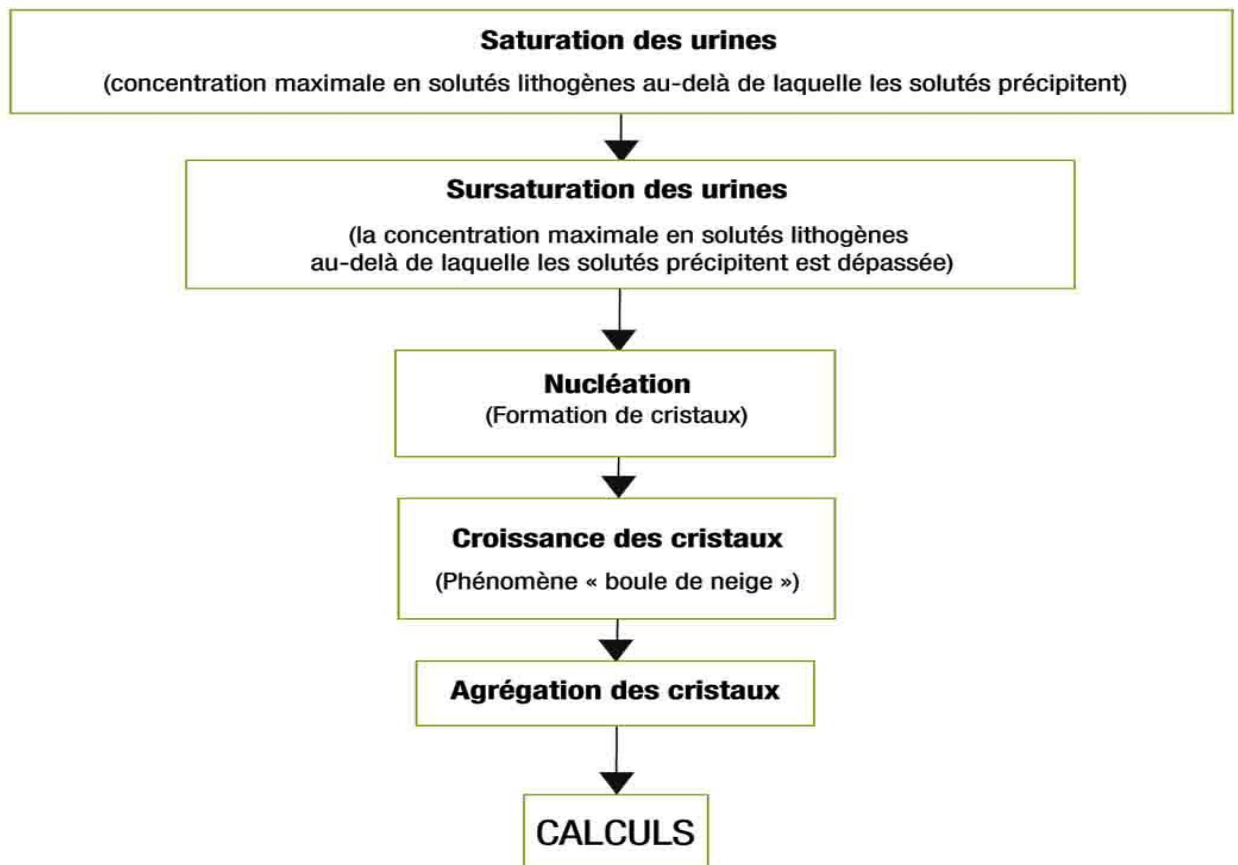


Figure 02 : Les étapes de formation des calculs.(Djemoui 2003).

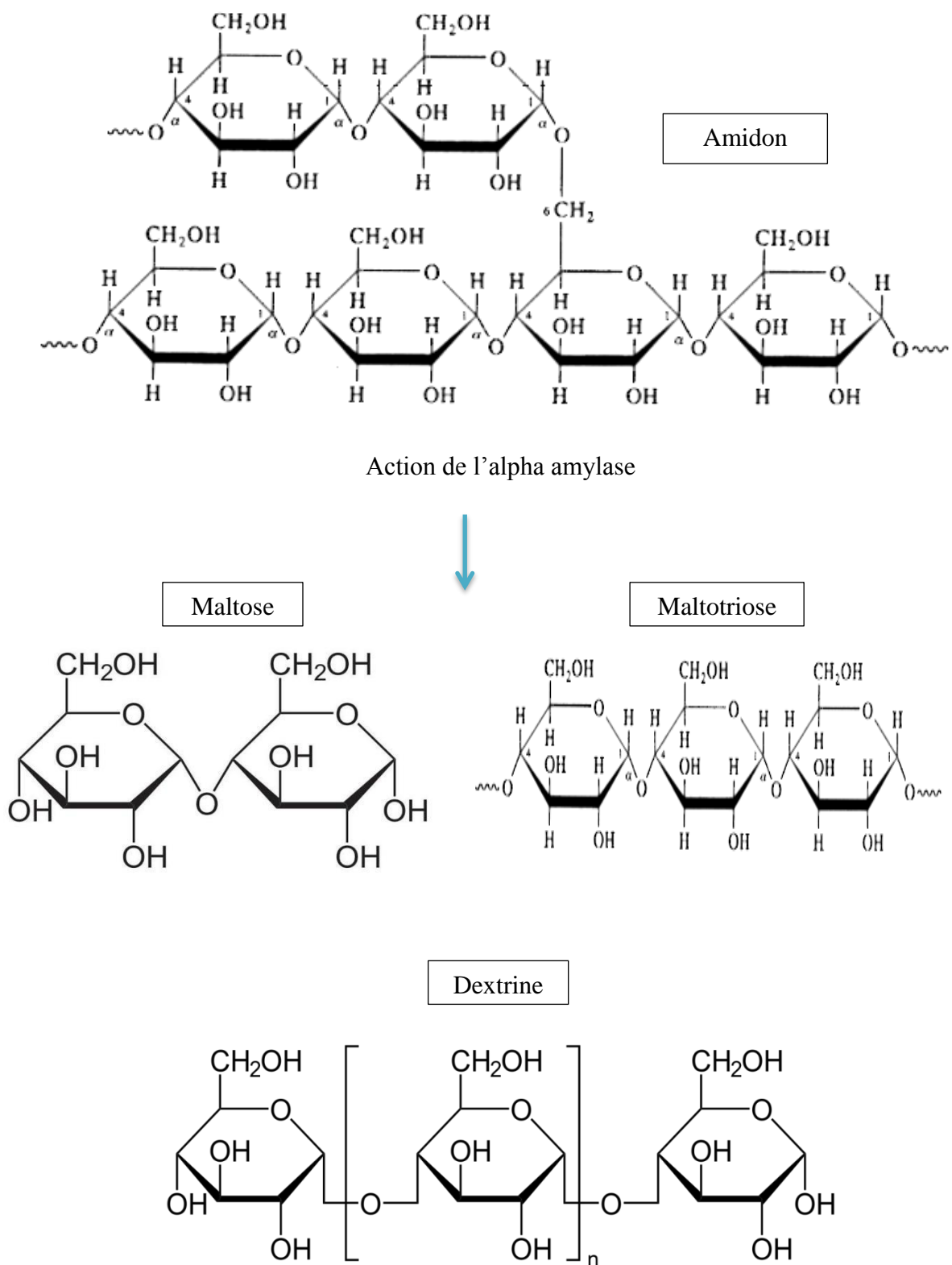


Figure 03 : Produit de dégradation de l'amidon par l'alpha amylase.

ملخص :

محتوى المركبات الفينولية وتثبيت الالتهاب وتثبيت ألفا الأميليز لمستخلصات الميثانول من الفستق الأطلسي. أظهرت النتائج أن المستخلصات الخام لا تحتوي فقط على مركبات الفينول. تم العثور على أفضل كميات من مركبات الفينول في كسور إيثيل الأسيتات (1680.47 ملغم / EAG 100)، ومعظم المستخلصات لديها القدرة على تثبيت تفاعل البلورة الأكساليكولوجية. أفضل مثبطات هي المستخلص المائي مع نسبة تثبيط بنسبة 93.57٪ تليها جزء الماء في نظام 4:6 مع تثبيط بنسبة 98.59٪. جميع كسور جميع أنظمة المذيبات المستخدمة تمنع ألفا الأميليز. سجل المستخلص المائي جزء خلات الإيثيل في نظام 4:6 أفضل قيمة لتثبيت النسبة المئوية (73,87%/72.91).

الكلمات المفتاحية: البطم الاطلسي، المركبات الفينولية، نسبة تثبيط التحسس، ونسبة تثبيط ألفا الأميليز..

Résumé :

Le contenu en composés phénoliques et les pouvoir antilithiasique et d'inhibition de l'alpha-amylase des extraits méthanoliques et aqueux des fruits de pistachier de l'atlas ont été évalués. Les résultats montrent que les extraits bruts ne contiennent pas que les composés phénoliques. Les meilleures valeurs en quantités des composés phénoliques ont été trouvées dans les fractions acétate d'éthyle (1680,47 mg/100 EAG), La majorité des extraits possèdent la capacité à inhiber la réaction de la cristallisation oxalocalcique. Les meilleurs inhibiteurs sont l'extrait aqueux avec un pourcentage d'inhibition de 93,57 % suivi par la fraction eau dans le système 4 :6 avec un pourcentage d'inhibition 98,59%. Toutes les fractions de tous les systèmes de solvants utilisés inhibent l'alpha- amylase. Les meilleures valeurs du pourcentage d'inhibition de la fraction aqueuse et acétate d'éthyle dans le système 4 :6 dont les valeurs sont égales à 73,87%, 72,91% respectivement.

MOTS-CLES : Pistachier de l'Atlas, les composés phénoliques, pourcentage d'inhibition antilithiasique, le pourcentage d'inhibition d'alpha-amylase.

Abstract:

The content of phenolic compounds and the antilithiasis and alpha-amylase inhibition of methanolic extracts of pistachio fruit from the atlas. The results show that the crude extracts do not only contain the phenolic compounds. The best amounts of phenol compounds were found in the ethyl acetate fractions (1680.47 mg / 100 EAG). Most of the extracts have the ability to inhibit the reaction of oxalocalcic crystallization. The best inhibitors are the aqueous extract with a percentage inhibition of 93.57% followed by the water fraction in the 4: 6 systems with a percentage inhibition of 98.59%. All fractions of all solvent systems used inhibit alpha-amylase. The water fraction and ethyl acetate fraction in the 4: 6 systems recorded the best value of percent inhibition 73,87% 72.91%.

KEY-WORDS: Pistacia Atlantica, phenolic compounds, percentage of antilithiasis inhibition, percentage inhibition of alpha-amylase.