

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ AMAR TELIDJI LAGHOUE

FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



Thèse de doctorat LMD

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Doctorat

Spécialité : Biochimie Appliquée

Par : BEKHAOUA Abir

Investigation des effets d'extraits naturels de plantes spontanées locales sur α -amylase

Soutenu publiquement le 17/06/2021 devant le jury composé de :

<i>Présidente</i>	<i>Dr. ALLAL Farida</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. Laghouat</i>
<i>Examinatrice</i>	<i>Pr. BENAROUS Khedidja</i>	<i>Professeur</i>	<i>Univ. Laghouat</i>
<i>Examinatrice</i>	<i>Dr. MAHFOUDI Reguia</i>	<i>MCA</i>	<i>ENS. Laghouat</i>
<i>Examinatrice</i>	<i>Dr. RAHMANI Zehour</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. Ouargla</i>
<i>Encadreur</i>	<i>Dr. KHACHEBA Ihen</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. Laghouat</i>
<i>Co- Encadreur</i>	<i>Dr. BOUSSOUSSA Hadjer</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. Laghouat</i>

Année universitaire 2020/2021

A mes chers parents

A mon cher époux

A mes chers frères

A ma chère sœur

A mon cher fils

A toute ma famille

En premier lieu et avant tout je tiens à remercier DIEU le tous puissant qui m'a donné le courage, la patience et la force de terminer ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement madame KHACHEBA ihcen, Directrice de cette thèse, pour l'aide et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer, pour sa générosité et la grande patience dont elle a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles.

Je remercie également Madame BOUSSOUSSA Hadjer, Co-directrice de cette thèse d'avoir accepté de diriger mes travaux et d'être toujours disponible pour m'avoir aidé.

Mon travail de recherche s'est déroulé au laboratoire des sciences fondamentales de l'université Amar Telidji - Laghouat -, dont je remercie son directeur Pr. YOUSFI Mohamed pour l'accueil et les conditions et les matérielles scientifiques qui m'ont été offertes.

Je remercie madame ALLAL Farida, maître de conférences à l'université de Laghouat pour avoir accepté la présidence de jurys de ma soutenance de thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance envers les membres du jury : Pr. BENAROUS khedidja, Dr. MAHFOUDI Reguia, et Dr. RAHMANI Zhour, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci aussi aux Dr. HARRATH mohamed et Pr. BENAROUS khedidja, Pr. DJERIDANE omar et Dr. NIA samira qui m'ont énormément aidé et encouragé.

Je remercie en particulier Mr. CHAOUA housseyn, pour m'avoir donné l'occasion de réaliser des analyses par HPLC, merci pour votre aide.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Mme. ABDELALLI Khedidja et Mme. BOURANANE zahra, ingénieurs des laboratoires du département « sciences naturelles » et l'école normale de Laghouat, pour leur aide et soutien.

Mes plus profonds remerciements vont à mes parents Mohamed et Amaria. Aujourd'hui je regarde ma vie et je réalise que j'ai accompli de grandes choses grâce à vos prières et vos bons conseils. Tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude. J'implore Dieu, tout puissant, de vous accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur.

Je voudrais remercier également mon mari Ahmed pour son encouragement, son amour inconditionnel, son patience et son soutien qui m'a permis de réaliser le rêve tant attendu.

Je tiens à remercier DIEU le tout puissant qui m'a donné une bougie dans ma vie qui est mon fils Djoud Yazan. Que Dieu vous bénisse et vous protège et te garde tout au long De ta vie.

Et j'en viens à ma adorable soeur Noussiba, à celle qui a toujours été présente et continuent de l'être pour faire mon bonheur.

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements à mes frères Madjid et Abdellah qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce travail.

Je tiens également à remercier ma belle mère Fatna pour tout le soutien, la sympathie et l'amour que vous m'accordez. Que Dieu le tout puissant vous comble de santé, de bonheur et vous prouve une longue vie pleine de joie. Sans oublier à remercier mes belles sœurs pour leurs encouragements et leurs soutiens le long de mes études.

Mes remerciements iront également à mes collègues et amies M elle Manal Chalghuom et M elle Hind Hechachena , que ce soit pour les conseils, les services et plus particulièrement pour l'amitié qu'elles m'ont témoignés et qui grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur, m'ont soutenu en rendant agréable les moments passés ensemble.

Enfin, Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué et participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

استقصاء آثار المستخلصات الطبيعية لنباتات محلية تلقائية على الألفا أميلاز

تمتاز النباتات بقدرتها على إنتاج العديد من المركبات الفاعلة ذات البنى الكيميائية المختلفة والتي تلعب دورا هاما في المجال الصيدلاني. لذا في إطار المساهمة في تنمية الثروة النباتية كمصدر لمواد طبيعية نشطة بيولوجيا ، لاكتشاف مركبات جديدة ذات أهمية علاجية، اهتمنا بستة أنواع نباتية صحراوية محلية: أم دريقة، البرواق، الطفس، الدانون، الفيجل، الزهيدة.

قمنا بفحص فيتوكيميائي مما أدى إلى اختيار هذه النباتات الثلاثة: البرواق ، الطفس والفيجل و أجرينا إستخلاص المركبات المهمة بواسطة مذيبات عضوية ذات قطبية متزايدة مع قياس كمية الفينولات والفلافونيدات الكلية. تمت دراسة تأثير هذه المستخلصات على إنزيم من صنف ألفا أميلاز من مصدرين مختلفين وتقييم القدرة المضادة للأكسدة باستعمال أربعة اختبارات كيميائية. حاولنا أيضا عزل الجزيئات النشطة من المستخلص الأكثر فعالية.

أظهر تحليل محتوى المركبات الفينولية أن كمية محتوى الفينول تراوحت ما بين $0,08 \pm 0,00$ و $3,53 \pm 0,21$ مغ مكافئ لحمض الغاليك / غ من المادة الجافة ومحتويات الفلافونويد المكافئة للكيرسيتين تراوحت ما بين $0,004 \pm 0,00$ و $1,1 \pm 0,15$ مغ / غ.

أظهرت جميع المستخلصات تأثيرات مثبطة ضد الإنزيم ، حيث تراوحت قيم IC_{50} ما بين $0,0007 \pm 0,00$ و $4,3 \pm 0,27$ مغ / مل ، حيث تم تسجيل أفضل تثبيط لمستخلصات خلاص الإيثيل وثنائي كلور الميثان لجذور نبات البرواق بقيم $IC_{50} 0,0007 \pm 0,00$ و $0,03 \pm 0,00$ مغ / مل على التوالي.

سمحت محاولة عزل المكونات النشطة بجمع 24 جزءا. أظهرت غالبية هذه الأجزاء تأثيرات مثبطة على الإنزيم، حيث تراوحت قيم IC_{50} ما بين $2,63 \pm 0,20$ و $5,39 \pm 0,04$ مغ / مل.

أظهرت نتائج النشاط المضاد للأكسدة بالطرق الكيميائية الأربعة قدرة مضادة للأكسدة منخفضة مقارنة بمضادات الأكسدة القياسية حيث أن القيم هي بالميكرومولار مكافئ لفيتامين س / غ من المادة الجافة حيث تراوحت بين $0,05 \pm 1,75$ و $38,37 \pm 0,32$ لاختبار DPPH وبين $0,44 \pm 0,36$ و $66,5 \pm 2,54$ لاختبار ABTS وقيم تتراوح من $0,37 \pm 0,00$ و $38,20 \pm 0,03$ لاختبار CUPRAC و $0,041 \pm 0,00$ و $236,95 \pm 4,84$ لاختبار FRAP.

الكلمات المفتاحية: مستخلصات فينولية، ألفا أميلاز، البرواق، الفيجل، الطفس، نشاط مضاد للأكسدة.

Résumé

Investigation des effets d'extraits naturels de plantes spontanées locales sur α -amylase

Les plantes sont capables de produire de nombreuses molécules bioactives appartenant à différentes familles chimiques qui constituent une richesse largement exploitée en thérapeutique, ainsi dans le cadre d'une contribution à la mise en valeur du règne végétal comme source de substances bioactives naturelles, pour découvrir de nouveaux composés à intérêt thérapeutique, nous sommes intéressés à six espèces sahariennes locales : *Ammodaucus leucotrichus*, *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens*, *Cistanche tinctoria*, *Haplophyllum tuberculatum* et *Linaria aegyptiaca*.

Ces espèces, ont été soumises à un criblage phytochimique qui a mené à la sélection de trois d'entre elles : *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens* et *Haplophyllum tuberculatum* et nous avons effectué une extraction sur ces espèces par solvants organiques à polarité croissante avec une quantification des phénols totaux et des flavonoïdes. Nous avons étudié l'effet de ces extraits sur l'enzyme α – amylase de deux sources différentes et évaluer le potentiel antioxydant par quatre tests chimiques. Nous avons également tenté de faire un isolement des molécules actives de l'extrait le plus intéressant.

L'analyse du contenu en composés phénoliques a dévoilé des teneurs en phénols totaux variant entre $0,08 \pm 0,00$ et $3,53 \pm 0,21$ mg en équivalent d'acide gallique / g de la matière sèche et des teneurs en flavonoïdes équivalent de la quercitrine variant entre $0,004 \pm 0,00$ et $1,1 \pm 0,15$ mg/g.

Tous les extraits ont montré des effets inhibiteurs vis-à-vis de l'enzyme, avec des valeurs d'IC₅₀ variant entre $0,0007 \pm 0,00$ et $4,3 \pm 0,27$ mg / ml, dont les meilleures inhibitions ont été enregistrées pour les extraits acétate d'éthyle et dichlorométhane des racines d'*Asphodelus microcarpus* avec des valeurs d'IC₅₀ de $0,0007 \pm 0,00$ et $0,03 \pm 0,00$ mg/ml respectivement.

L'éventuelle tentative d'isolement des principes actifs, a permis de recueillir 24 fractions. La majorité de ces dernières ont montré des effets inhibiteurs vis-à-vis de l'enzyme, avec des valeurs d'IC₅₀ variant entre $2,63 \pm 0,20$ et $5,39 \pm 0,04$ mg / ml.

Les résultats de l'activité antioxydante par les quatre tests chimiques ont montré un faible pouvoir antioxydant comparativement aux antioxydants standards les valeurs sont en μ M équivalent de vitamine C/ g de matières sèche, les valeurs comprises entre $0,05 \pm 1,75$ et $38,37 \pm 0,32$ pour le test DPPH et entre $0,44 \pm 0,36$ et $66,5 \pm 2,54$ pour le test ABTS et des valeurs de variant de $0,37 \pm 0,07$ et $38,28 \pm 0,03$ pour le test CUPRAC et de $0,041 \pm 0,00$ et $236,952 \pm 4,84$ pour le test FRAP.

Mots clés : Extraits phénoliques, α - amylase, *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens*, *Haplophyllum tuberculatum*, activité antioxydante

Abstract

Investigation of the effects of natural extracts of local spontaneous plants on α -amylase

Plants are able to produce many bioactive molecules, from different chemical families, which are widely used in therapeutic, so with the general pattern of bringing one's contribution to the development of the vegetable reign as a source of natural bioactive substances to discover a new therapeutics compounds, we are interested in six local Saharan species: *Ammodaucus leucotrichus*, *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens*, *Cistanche tinctoria*, *Haplophyllum tuberculatum* and *Linaria aegyptiaca*.

These species were subjected to a phytochemical screening which led to the selection of three of them: *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens* and *Haplophyllum tuberculatum*. We performed extraction on these species by organic solvents with increasing polarity with a quantification of total phenols and flavonoids. We studied the effect of these extracts on an enzyme of the hydrolase class (α -amylase) from two different sources and evaluated the antioxidant potential by four chemical tests. In addition we tried to isolate the active molecules of the most active extract.

The analysis of the phenolic compounds amount revealed a contents varying between 0.08 ± 0.00 and 3.53 ± 0.21 mg in gallic acid equivalent / g of dry matter and a contents of flavonoids equivalent to quercetine varying between 0.004 ± 0.00 and 1.1 ± 0.15 mg/g.

All extracts showed an inhibitory effects towards the enzyme, with IC_{50} values ranging from $0.0007 \pm 0,00$ to $4,3 \pm 0.27$ mg / ml, which the best inhibitions were recorded for ethyl acetate and dichloromethane extracts of *Asphodelus microcarpus* roots with IC_{50} values of $0.0007 \pm 0,00$ and 0.03 ± 0.00 mg/ml, respectively.

The eventual attempt to isolate the active principles, collected 24 fractions. The majority of these showed inhibitory effects towards the enzyme, with IC_{50} values ranging from 2.63 ± 0.20 to 5.39 ± 0.04 mg / ml.

The results of the antioxidant activity determined by the tests: ABTS, CUPRAC, DPPH and FRAP showed a low antioxidant power compared to the standard antioxidants, values are in μ M vitamin C equivalent/g dry weight, with values ranging from 0.05 ± 1.75 to 38.37 ± 0.32 for the DPPH test and from 0.44 ± 0.36 to 66.5 ± 2.54 for the ABTS test and values ranging from 0.37 ± 0.07 to 38.28 ± 0.03 for the CUPRAC test and from 0.041 ± 0.00 to 236.95 ± 4.84 for the FRAP

Keywords : phenolic extracts, α -amylase, *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens*, *Haplophyllum tuberculatum*, antioxidant activity.

ABTS	: 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique Acid)
ADN	: Désoxyribonucléique
ARN	: Acide RiboNucléique
BHA	: Butylhydroxyanisol
BHT	: Butylhydroxytoluène
CAT	: Catalase
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CE	: électrophorèse capillaire
CNPM3	: 2 - Chloro - 4 - nitrophényl - α - D – maltotrioside
CUPRAC	: Cupric ion reducing antioxidant capacity
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DNS	: Acide 3,5-dinitrosalicylique
EAG	: Équivalent acide gallique
EC₅₀	: Concentration efficace médiane.
EOA	: Espèces oxygénés actives
ERO	: Espèces réactives de l'oxygène
FRAP	: Ferric reducing-antioxidant power.
GC	: Phase gazeuse
GLUT4	: Transporteur de glucose 4
GSH-Px	: Glutathion peroxydase
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène
HPLC	: High – performance liquid chromatography
IC₅₀	: Half maximal inhibition concentration
MS	: Matière sèche
ORAC	: Oxygene radical absorbance capacity.
pH	: Potentiel hydrogène
QE	: Quercetin equivalent

R.L	: Radicaux libres
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
RNS	: Reactive nitrogen species
ROS	: Reactive oxygen species
SOD	: superoxyde dismutase
SM	: Spectrométrie de masse
TD2	: Diabète type deux
UV	: Ultrat violet
VCEAC	: Vitamin C Equivalent Antioxydant Capacity

Figure I.1.	Les mécanismes d'action des plantes médicinales et leurs évaluations thérapeutiques.	11
Figure II.1.	Schéma réactionnel de l'action de l' α -amylase sur l'amidon comme substrats	32
Figure II.2.	Schéma de réaction de l'hydrolyse du α maltotrioside-2-chloro-4-nitrophényle (CNPG3) par α - amylase	38
Figure II.3.	Schéma réactionnel représente la Réduction du radical libre DPPH	46
Figure II.4.	Structure du 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) : forme réduite ABTS, forme radical cation ABTS ^{•+}	48
Figure II.5.	La réaction CUPRAC et le complexe Cu-néocuproïne	49
Figure II.6.	La réaction FRAP et le complexe Fe ³⁺ - TPTZ	50
Figure III.1.	Fractionnement sur colonne ouverte	84
Figure III.2.	Analyse des fractionnements par CCM	85

Liste des tableaux

Tableau I.1.	Classement des antidiabétiques oraux	10
Tableau II.1.	Systématique, description, utilisation et principes actifs des plantes choisies pour le criblage	18
Tableau III. 1.	Aspect, teneurs et couleurs des extraits aqueux des plantes investiguées	51
Tableau III. 2.	Résultats des tests phytochimiques sur les trois nouveaux échantillons des plantes sélectionnées	52
Tableau III. 3.	Aspect, couleurs et teneurs des extraits des trois métabolites secondaires des trois plantes étudiées	55
Tableau III. 4.	Aspect, couleurs et teneurs des extraits organiques à polarité croissante	57
Tableau III. 5.	Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits aqueux des plantes investiguées	60
Tableau III. 6.	Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des composés phénoliques des extraits hydro-alcoolique	61
Tableau III. 7.	Teneur en phénol totaux et en flavonoïdes des différents extraits organiques des trois plantes étudiées..	63
Tableau III. 8.	Pourcentage d'inhibition des extraits aqueux des plantes investiguées	67
Tableau III. 9.	Valeurs des IC ₅₀ (mg/ml) des extraits des métabolites secondaires vis - à vis de l' α - amylase	69
Tableau III. 10.	Taux d'inhibition des extraits organiques des plantes étudiées vis - à vis de l' α - amylase salivaire et d' <i>Aspergillus oryzae</i>	72
Tableau III. 11.	Valeurs des IC ₅₀ (mg/ml) des organiques des plantes étudiées vis - à vis de l' α - amylase d' <i>Aspergillus oryzae</i>	77
Tableau III. 12.	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne ouverte de l'extrait Dichlorométhane des tubercules d' <i>Asphodelus microcarpus</i>	83
Tableau III. 13.	Taux d'inhibition des 24 fractions de l'extrait dichlorométhane de la partie racinaire de la plante <i>Asphodelus microcarpus</i> vis - à vis de l' α - amylase.	85

Liste des tableaux

Tableau III. 14.	Valeurs des IC ₅₀ en mg/ml des meilleures fractions de l'extrait dichlorométhane des racines d' <i>Asphodelus microcarpus</i> vis - à vis de l' α – amylase	86
Tableau III. 15.	Evaluation de l'activité antioxydant des extraits organique par quatre tests	89

Dédicace	I
Remerciements	II
ملخص	IV
Résumé	V
Abstract	VI
Liste des abréviations	VII
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	X
Introduction	2
I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1. Les plantes et la thérapie	6
I.2. Principes actifs des plantes	7
I.3. Activité antidiabétique	8
I.3.1. Antidiabétiques oraux	9
I.3.2. Antidiabétiques naturels	10
I.4. Activité antioxydante	12
I.4.1. Antioxydants de synthèses	14
I.4.2. Antioxydants naturels	14
I.5. Stress oxydant et diabète	14
II. PARTIE EXPERIMENTALE	
II.1. Matériel végétale	17
II.2. Préparation des extraits	24
II.2.1. Extraction aqueuse	24
II.2.2. Extraction organique	24
II.2.2.1. Tests phytochimiques	25
II.2.2.2. Extraction des composés phénoliques	26
II.2.2.3. Extraction des alcaloïdes	27
II.2.2.4. Extraction des huiles essentielles	28
II.2.2.5. Extraction par solvant à polarité croissante	28
II.3. Analyses phytochimiques des extraits	29
II.3.1. Quantification des phénols totaux	29
II.3.2. Quantification des flavonoïdes	30
II.4. Effet d'inhibition des trois plantes sur l'α - amylase	30
II.4.1. Effets d'inhibition des extraits aqueux	31
II.4.2. Effets d'inhibition des extraits des trois métabolites secondaires (composés	34

phénoliques, alcaloïdes et huiles essentielles)	
II.4.3. Effets d'inhibition des extraits organiques à polarité croissante	36
II.5. Tentative d'isolement	38
II.5. 1. Choix de l'extrait	40
II.5. 2. Chromatographie sur couche mince	41
II.5. 3. Extraction	42
II.5. 4. Fractionnement sur colonne ouverte	42
II.5. 5. Effet des fractions sur l' α - amylase	43
II.6. Evaluation de l'activité antioxydante	44
II.6.1. Test DPPH	45
II.6.2. Test ABTS ^{•+}	46
II.6.3. Test CUPRAC	48
II.6.4. Test FRAP	48
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS	
III.1. Préparation des extraits	51
III.1.1. Extraction aqueuse	51
III.1.2. Tests photochimiques	52
III.1.3. Extraction des trois métabolites secondaires (composés phénoliques, alcaloïdes et huiles essentielles)	54
III.1.4. Extraction par solvant organique à polarité croissante	56
III.2. Quantification des phénols totaux et des flavonoïdes	59
III.3. Effet d'inhibition des trois plantes sur l'α – amylase	66
III.3.1. Effets d'inhibition des extraits aqueux	67
III.3.2. Effets d'inhibition des extraits des trois métabolites secondaires (composés phénoliques, alcaloïdes et huiles essentielles)	68
III.3.3. Effets d'inhibition des extraits organiques à polarité croissante	71
III.4. Tentative d'isolement	79
III.4.1. Extraction	79
III.4.2. Fractionnement sur colonne ouverte	80
III.4.3. Effet des fractions sur l' α – amylase	84
III.4.4. Détermination des IC ₅₀ des meilleures fractions inhibitrices	86
III.5. Evaluation de l'activité antioxydant des extraits organique	88
CONCLUSION	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	101
ANNEXES	115

Introduction

Les plantes ont toujours constitué la base des systèmes de la médecine traditionnelle, depuis des milliers d'années et continuent jusqu'à présent à nous fournir de nouveaux remèdes. Le règne végétal, représente ainsi une bonne source de préparations naturelles dont l'action provient de ses composés bioactifs ou d'une synergie entre ces différents composés chimiques (Gurib-Fakim, 2006 ; Ložienė *et al.*, 2007).

Les nombreux principes actifs que renferment les plantes médicinales, sont issus du métabolisme secondaire. A cet effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches ; ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux est principalement les flavonoïdes qui sont reconnus comme agents préventifs contre plusieurs maladies ; parmi lesquelles celles associées au stress oxydant, tel que le cancer et les maladies cardio – vasculaires. Ainsi ils ont fait l'objet de nombreuses recherches comme antioxydants naturels très puissants pouvant remplacer des antioxydants synthétiques. Aussi s'ajoutent à leurs propriétés antioxydantes, leurs capacités d'inhiber l'activité d'un nombre important d'enzymes : digestives comme l' α -amylase, l' α - glucosidase, la pepsine, la trypsine et les lipases ainsi que des oxydoréductases, des ADN synthétases, des ARN polymérases, la lipoxigénase et la glutathion S-transférase (Khacheba *et al.*, 2014 ; Benarous *et al.*, 2015).

Le diabète qui est une maladie chronique caractérisé par une hyperglycémie, est en large propagation et est reconnu comme une source de stress oxydant accru ; qui se traduit par un dysfonctionnement cellulaire favorisant le développement d'une large variété de complications critiques, y compris les dommages rénaux, cardiovasculaires et neurologiques (khacheba *et al.*, 2016). Avec l'ampleur que prend le diabète sucré à l'échelle mondiale et en raison de ces graves conséquences, la communauté scientifique est en travail continue à la recherche de nouvelles thérapies naturelles plus efficaces et de nouveaux agents anti-hyperglycémiant.

L'Algérie, par la richesse et la diversité de sa flore, constitue un véritable réservoir phylogénétique, avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes (Hamel *et al.*, 2018), reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique. La valorisation des plantes médicinales de la flore nationale sera une grande contribution à l'industrie pharmaceutique de l'Algérie et aura un impact économique important (Sebaa *et al.*, 2018). Dans cette optique, le sujet a été choisi dans l'espoir d'enrichir les banques de données

de référence de la phytothérapie algérienne, et afin d'intégrer les plantes locales de la région de Laghouat dans leur grande diversité de profils.

Notre travail, rentre dans les activités du laboratoire des sciences fondamentales de l'université Amar Telidji de Laghouat ; et s'inscrit dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles d'origine végétale locales du Sahara et du Sub - Sahara algérien à la recherche d'activités biologiques. Et est une continuité d'un travail déjà réalisé par nous-même, sur dix-huit plantes médicinales utilisées par la population locale contre le diabète en 2015 (Bekhaoua et Bensayeh, 2015).

La présente étude, est une contribution à la valorisation phytochimique de trois plantes spontanées locales *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens*, *Haplophyllum tuberculatum*, à caractères médicinales ; d'une part, par l'étude antidiabétique *in vitro* de leurs extraits aqueux, phénoliques et huiles essentielles ; afin de proposer une solution possible aux problèmes de diabète et d'autre part par l'évaluation de leurs activités antioxydantes. L'assortiment de ces plantes est basé sur des données ethnopharmacologiques indiquant leur utilisation contre certaines maladies notamment le diabète ainsi que la nouveauté de leur étude.

Par le présent travail, nous essayerons également d'apporter une contribution à la valorisation des ressources végétales locales par une meilleure connaissance des données phytochimiques relatives à ce patrimoine et la mise en évidence des principes actifs issus du métabolisme secondaire de ces plantes.

Le premier chapitre, est une synthèse bibliographique qui comporte, un aperçu sur les plantes à effet thérapeutique et leurs principes actifs, ainsi que les activités antidiabétique et antioxydante.

Le second chapitre, est consacré à la description botanique des trois plantes ainsi que la présentation des protocoles expérimentaux entrepris dans cette étude. Dans lequel, sont exposés des méthodes classiques et simples de préparation des extraits aqueux, phénoliques et d'huiles essentielles, ainsi que le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes. Puis l'étude de l'activité antidiabétique *in vitro* par effet inhibiteur sur l'activité enzymatique de l' α - amylase. Comme il présente également, les étapes de la tentative d'isolement des molécules bioactives à partir de l'extraits qui a présenté le meilleur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l' α -

amylase ; par CCM et chromatographie sur colonne ouverte. Et pour finir, l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* par quatre tests chimiques (ABTS, CUPRAC, DPPH, et FRAP).

Dans le dernier chapitre de cette étude, sont présentés les différents résultats obtenus et leurs discussions et nous terminerons notre thèse par une conclusion générale avec quelques perspectives.

I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les plantes et la thérapie

Les plantes s'imposent sur la planète par leur aspect, leur exubérance et leur mystère. Depuis les temps les plus reculés l'Homme a cherché un moyen d'assouvir sa faim. Il a trouvé chez les végétaux des aliments nourrissants, mais aussi des remèdes à ses maux et il a appris à ses dépens à discerner les plantes toxiques. Ces connaissances, transmises d'abord oralement, l'ont ensuite été dans les écrits et il subsiste des traces de l'emploi des plantes comme médicaments par les Anciens dans les plus vieilles civilisations (Kemassi *et al.*, 2014).

L'étude des anciennes civilisations chinoise, hindoue et, au nouveau monde, de celle des Aztèques du Mexique et des Incas du Pérou, montre une connaissance poussée des plantes médicinales et toxiques. Plus près de nous, les Grecs héritèrent, de la même manière, de certaines drogues orientales par l'intermédiaire des Perses. Chez les Romains, Aulus Cornelius Celsus a décrit 250 drogues. Pline l'Ancien a rapporté dans plusieurs volumes de son Histoire naturelle les vertus médicinales des plantes. Claudius Galenus dit Galien, que l'on considère comme le père de la pharmacie galénique, donnait des recettes pour la préparation des médicaments ; il a influencé la médecine occidentale pendant des siècles (Chabrier, 2010).

Dans les régions les plus reculées de l'Afrique, les peuples nomades, au Maroc, au Topnaar, en Namibie, conservent des traditions herboristes ancestrales. Pour ces peuples, la guérison dépend d'un monde magique dans lequel les esprits influents sur la maladie et la mort. Dans la culture berbère, la possession par un esprit est une cause principale de la maladie, le guérisseur prescrit des plantes aux propriétés « magiques » pour rétablir la santé. L'échec des traitements pharmaceutiques conventionnels, surtout dans le cas de maladies chroniques, la forte incidence des effets indésirables qui leur sont associés et l'insuffisance des infrastructures sanitaires dans les pays en voie de développement font qu'une large tranche de la population mondiale dépend essentiellement de la médecine naturelle, complémentaire ou parallèle pour se soigner (Bouxi, 2012).

Avec l'expérience, avec l'érudition des religieux et les cultures tentées autour des monastères, s'accrut peu à peu l'intérêt porté aux plantes médicinales. Le même instinct, générateur du même empirisme, est toujours à la base de la médecine populaire, que ce soit dans nos campagnes ou chez certains primitifs d'outre-mer (Boullard, 2001). Aujourd'hui, les plantes

sont non seulement indispensables aux soins de santé, mais elles constituent le meilleur espoir de trouver de futurs médicaments fiables (Refaz *et al.*, 2017).

Parmi les nombreux facteurs qui contribuent à l'utilisation potentielle des médicaments à base de plantes, l'approche holistique des problèmes de santé, la sécurité, l'absence d'effets indésirables et secondaires ont été trouvés pour influencer particulièrement l'utilisation de ces médicaments dans les pays développés tandis que leur accessibilité, leur prix abordable, leur contexte historique et culturel, en plus des facteurs susmentionnés, favorisent leur utilisation dans les pays en développement. Ajouté à ces points forts et les preuves cliniques d'innocuité fournies par certains médicaments à base de plantes, les phytothérapies traditionnelles ont sans aucun doute le potentiel de contribuer de plus en plus à un meilleur système de soins de santé dans de nombreux pays (Haq, 2004)

I.2. Principes actifs des plantes

Une plante médicinale est définie comme étant toute plante qui a composés qui peuvent être utilisés à des fins thérapeutiques ou qui contiennent des précurseurs de la synthèse chimio-pharmaceutique. Partout dans le monde, les plantes sont utilisées traditionnellement pour traiter de nombreuses affections, en particulier les maladies infectieuses, telles que la diarrhée, la fièvre, le rhume, ainsi que pour le contrôle des naissances et l'hygiène dentaire. De même, de nombreuses substances psychoactives utilisées dans la médecine traditionnelle sont d'origine végétale. Les plantes médicinales utilisées traditionnellement produisent une variété de propriétés thérapeutiques connues (Jain *et al.*, 2019).

Les propriétés médicinales des plantes sont dues à une gamme extraordinaire de produits du métabolisme appelés métabolites secondaires. Ils représentent toutes substances présentes chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante par opposition aux métabolites primaires. Leur nature et leur teneur peuvent être modifiées par des facteurs abiotiques, facteurs environnementaux spatiaux (exposition, altitude, climat, ...) ou temporels (saison, âge, ...), et les molécules induites par des facteurs biotiques, telles les phytoalexines excitées par la présence d'un pathogène. Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent des dizaines de milliers de molécules différentes classées classiquement en trois grandes catégories: Les composés phénoliques, les composés terpéniques et les alcaloïdes. Outre leur très grande diversité chimique, ces métabolites secondaires se caractérisent généralement par de faibles concentrations dans les tissus

végétaux ainsi que par leur stockage souvent réalisé dans des cellules ou organes spécialisés (Xiuzhen *et al.*, 2007).

Les métabolites secondaires, ont une importance commerciale pour l'humanité. Ils ont été utilisés comme colorants, fibres, colles, huiles, cires, agents aromatisants, médicaments et parfums et sont considérés comme des sources potentielles de nouveaux médicaments naturels, d'antibiotiques, d'insecticides et d'herbicides (Fraga, 2010).

I.3. Activité antidiabétique

Le diabète sucré est une maladie métabolique endocrinienne causée par l'alternation du métabolisme des glucides, qui se caractérise par des niveaux anormalement élevés de glucose plasmatique causant l'élévation de la glycémie ce qui est qualifié d'hyperglycémie ; résultant d'un déficit absolu ou relatif de sécrétion d'insuline par les cellules β de Langerhans du pancréas, ou l'action de cette dernière qui se traduit par une diminution de la réactivité des organes à l'insuline sécrétée, ou à une combinaison des deux. Cette maladie est la conséquence d'une interaction des variables facteurs héréditaires (acquis) et environnementaux (Telli, 2017).

L'hyperglycémie est une glycémie à jeun supérieure à 1.26 g/l (7 mmol/l), ou une glycémie à n'importe quel moment de la journée supérieure à 2 g/l (11.1 mmol/l), ou encore une glycémie à la deuxième heure de l'hyperglycémie provoquée orale supérieure ou égale à 2 g/l, et ce à deux reprises. (Telli, 2017).

Cette maladie est en augmentation rapide dans le monde entier et touche toutes les régions du monde, dont la forme la plus répandue est le diabète non insulino – dépendant (DNID / type II) qui affecte environ 285 millions de personnes, soit 6. 4% de la population mondiale pour l'année 2010, avec une augmentation estimée à 435 millions en 2030. Le diabète de type 2 est associé à des complications micro et macro vasculaires telles que la rétinopathie diabétique (entraînant une déficience visuelle ou la cécité), la neuropathie diabétique (entraînant un engourdissement et des douleurs aux extrémités), la néphropathie diabétique (entraînant une insuffisance rénale) et les maladies cardiovasculaires dues à l'augmentation et à la fluctuation du glucose dans le sang (Khacheba *et al.*, 2016).

Les antidiabétiques agissent en général en abaissant la glycémie. Il y a différents types d'antidiabétiques, et leur utilisation dépend de la nature du diabète, du dosage de l'hémoglobine glyquée, de l'âge et de la situation de la personne, et de bien d'autres facteurs (Ponnusamy *et al*, 2011).

I.3.1. Antidiabétiques oraux

Le traitement du diabète dépend du stade de la maladie. Dans les premiers stades, il peut être géré par un régime alimentaire et une activité physique. Lorsque la glycémie moyenne n'est pas atteinte, un traitement médicamenteux peut devenir nécessaire.

Ces médicaments agissent par différents mécanismes d'actions : augmentation de la sensibilité périphérique à l'insuline, diminution de l'absorption de glucose ou augmentation de la sécrétion de l'insuline. Plusieurs classes thérapeutiques de médicaments antidiabétiques existent reposant sur des mécanismes d'action différents, administrées seules ou associées entre elles (Tableau I.1).

Toutefois, l'utilisation continue de ces agents de synthèse devraient être réduite car ces inhibiteurs sont connus pour provoquer de nombreux effets secondaires, tels que les symptômes gastro-intestinaux indésirables (flatulences, ballonnement, crampes abdominales, vomissements, distension abdominale et diarrhée). En outre, certains d'entre eux peuvent augmenter l'incidence des tumeurs du rein, des troubles du foie (l'atteinte hépatique et d'hépatite aiguë). Ces effets secondaires ont pu être causés par l'inhibition excessive de α -amylase pancréatique, conduisant à une fermentation bactérienne des glucides non digérés dans le côlon. Ces médicaments présentent d'autres inconvénients tels que la toxicité hépatique et augmentent les symptômes et les facteurs de risque des maladies du cœur (Chang *et al.*, 2013).

Tableau I.1. Classement des antidiabétiques oraux (Chang *et al.*, 2013)

Classe	Mécanisme d'action	Effet secondaire possible	Moment optimum de la prise
Sulfamides hypoglycémiants	Cette classe stimule l'insulino-sécrétion	- Effet antabuse - Trouble digestifs, hépatites cholestatiques	Plus de 30 min avant le repas
Biguanidines	- Diminuent la production hépatique du glucose, l'absorption intestinale du glucose. - Augmente la consommation périphérique du glucose et la sensibilité à l'insuline	- Troubles dose-dépendants - Malabsorption de vitamine B12 ; acidose lactique	Au moment du repas
Inhibiteurs des alpha-glucosidase et alpha-amylose	Ralentissent la digestion de l'amidon	Troubles digestifs	Avant la première bouchée du repas
Métaglinidines ou glinides	Les molécules de cette classe stimulent l'insulino-sécrétion	Trouble digestifs ; élévation des enzymes hépatiques ; réaction cutanées allergiques	Avant le repas (pas plus de 15 min avant)
Incrétinomimétiques I : dipeptidylpeptidase-4	Les molécules de cette classe inhibent le dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) par l'augmentation du taux de glucagon	Trouble infectieux ; trouble gastro-intestinaux ; affections rhumatologiques ; trouble sanguins lymphatique	Avant le repas

I.3.2. Antidiabétiques naturels

Bien que le traitement pour les diabétiques de type II a été amélioré dans une certaine mesure au cours de la dernière décennie et malgré l'introduction d'agents hypoglycémiantes de sources synthétiques, la mortalité due au diabète et à ses complications secondaires continue d'être un problème médical majeur. La gestion du diabète par drogues chimiques sans aucun effet secondaire est encore un défi pour le système médical et le but idéal des chercheurs (Grover *et al.*, 2002).

Les médicaments à base de plantes sont largement prescrits en raison de leur efficacité, de leurs effets secondaires réduits et de leur coût relativement faible (Phan *et al.*, 2013).

De nombreux profils de plantes à propriétés hypoglycémiques, ont été rapportés dans la littérature. Les familles de plantes les plus étudiées pour leurs effets d'hypoglycémie incluent : la famille des Fabacées, des Lamiacées, des Liliacées, des Cucurbitacées, des Astéracées, des Moracées, des Rosacées, des Euphorbiacées et des Araliacées (Mukherjee *et al.*, 2006).

Les plantes antidiabétiques ont divers effets sur le corps humains et agissent à différents sites figure I.1 (Arulselvan *et al.* 2014) :

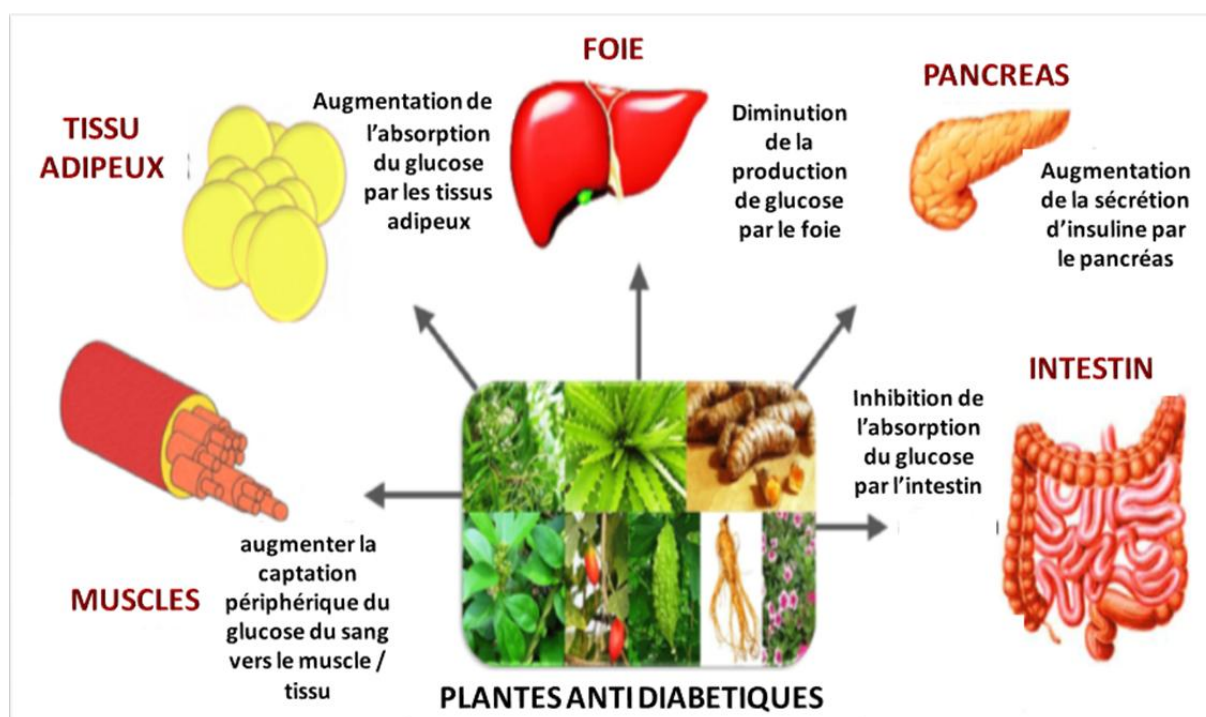


Figure I.1. Les mécanismes d'action des plantes médicinales et leurs évaluations thérapeutiques.

Un bon nombre de plantes sont connues pour exercer leur activité antihyperglycémiant via l'inhibition des enzymes hydrolysants les glucides. C'est pourquoi les inhibiteurs naturels des enzymes digestives à partir de sources végétales, ont offert une stratégie intéressante pour le contrôle de l'hyperglycémie (Ponnusamy *et al.*, 2011)

Plusieurs études ont rapporté l'isolement d'inhibiteurs d' α - amylase de plantes. Ces inhibiteurs isolés ont été rapportés pour leurs efficacités pour diminuer la glycémie avec des effets secondaires minimes. Les principaux constituants sont les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les saponines, les stéroïdes, les hydrates de carbone (les glycosides, les glycolipides, les polysaccharides, les peptidoglycanes, la gomme de galactomannane, les

hypoglycanes, la guanidine, les glycopeptides), les acides aminés et les ions inorganiques. Ces derniers affectent diverses cascades métaboliques, qui affectent directement ou indirectement le niveau de glucose dans le corps humain. Beaucoup d'entre eux peuvent être trouvés dans une seule plante et leur action synergique combinée peut donner les comportements observés. (Grover *et al.*, 2002).

I.4. Activité antioxydante

L'oxygène, substance indispensable à la vie des organismes aérobie, peut dans certaines circonstances, présenter un danger mortel par la formation d'espèces oxygénés actives (EOA), elles sont appelées également espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou plus communément radicaux libres (R.L) (Médart, 2009)

Les radicaux libres sont toutes espèces chimiques (atome ou molécule) contenant un ou plusieurs électrons non appariés. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron, (Cano *et al.*, 2007) extrait aux molécules voisines au cours de réactions en chaîne, soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. La probabilité d'aller vers l'une ou l'autre de ces deux possibilités dépend essentiellement de l'instabilité du radical considéré, si cette instabilité est importante, l'électron libre est rapidement transféré sur une autre molécule. En d'autres termes, l'électron passe sur une molécule non prévue pour cet effet. Parmi ces molécules, certaines deviennent très réactives vis-à-vis de l'oxygène et subissent une oxydation définitive. Pour autant, le caractère radicalaire de la molécule ne disparaît pas et l'électron libre peut passer sur d'autres molécules entraînant des phénomènes d'oxydation en chaîne (Cano *et al.*, 2007).

Une libération excessive de radicaux libres ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut entraîner une situation de déséquilibre qualifiée de stress oxydant ; qui se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre la production d'ERO et les systèmes de défenses antioxydants, en faveur des premières. Le stress oxydant peut avoir diverses origines : mauvaise alimentation, phénomènes inflammatoires chroniques ou aigus, habitudes de vie non adéquates (tabagisme, consommation excessive d'alcool), exercice physique intense ou mal géré, exposition inconsidérée à de grandes sources productrices d'ERO et aux radicaux ionisants (exposition importante au soleil, irradiation et radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, le contact avec certains pesticides et solvants, la prise de certains médicaments, tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment

une perte de poids importante, interventions chirurgicales (transplantation d'organes). Aussi sous diverses conditions telles que l'allaitement, la fièvre, l'infection et même à jeûne, l'activité des radicaux augmente. Une situation de stress oxydant peut se développer avec l'âge (Roche *et al.*, 2008).

Les EOA peuvent induire des dommages oxydatifs souvent irréversibles au niveau d'un grand nombre de substrats biologiques : protéines (inactivation de protéines), ADN (cassures d'ADN), lipides : oxydation des lipides des membranes cellulaires et des membranes mitochondriales, enzymes, glucose). Aussi s'ajoute le cerveau qui est le tissu le plus sensible au dommage oxydant. En raison de son besoin élevé et constant en oxygène (Sharif *et al.*, 2008).

Les EOA sont responsables des processus du phénomène de vieillissement et de pathologies multiples : initiation et promotion des cancers, maladies cardio – vasculaires, inflammation et pathologies neurodégénératives (maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, sclérose latérale amyotrophique), cataracte, dégénérescence musculaire, sclérose en plaques, syndrome de Down, inflammation, infections virales, pathologies auto-immunes et troubles du système digestif tels que l'inflammation gastro-intestinale et l'ulcère. D'autres maladies neurodégénératives significativement associées au stress oxydatif comprennent la maladie de Creutzfeldt-Jacob et la méningo-encéphalite (Laguerre *et al.*, 2007)

Afin que les ERO n'exercent donc pas de façon incontrôlée leurs effets délétères, l'organisme dispose d'un vaste réseau de défense : les antioxydants. Il existe deux sources de défenses antioxydantes : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et de légumes riches en vitamines C, vitamine E (alpha tocoopherol), caroténoïdes, ubiquinone, polyphénols, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque, tandis que l'autre est endogène et se compose d'enzymes (SOD superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) ou de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine). A cela s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des co-facteurs importants pour l'activité de certains enzymes antioxydantes (Delattre *et al.*, 2005).

Les antioxydants réagissent avec les oxydants et soit stoppent, soit ralentissent le processus d'oxydation. Pendant cette réaction, les antioxydants s'oxydent et deviennent parfois des radicaux qui peuvent se transformer en dérivés stables ou persister un certain temps sous forme radicalaire. Les formes radicalaires des antioxydants peuvent devenir pro oxydants dans certaines conditions. Ainsi les antioxydants peuvent agir comme piègeurs de radicaux

libres et / ou activateurs de la défense antioxydante des systèmes enzymatiques pour supprimer les dommages des radicaux dans les systèmes biologiques (Wainsten, 2009).

I.4.1. Antioxydants de synthèse

La plupart des antioxydants utilisés commercialement par exemple, butylhydroxytoluène (BHT) et butylhydroxyanisol (BHA)] sont synthétiques et certains d'entre eux ont été soupçonné de causer ou de favoriser des effets négatifs sur la santé tel que les cancers (Shahin, 2008) et, par conséquent, certaines restrictions sont placées sur leurs applications et il y a une tendance à les remplacer par des antioxydants naturels. Ces dernières années, la recherche d'antioxydants naturels en particulier à partir de plantes a augmenté et certaines plantes médicinales ont été largement étudiées pour des activités anti-oxydantes (Bahman *et al*, 2008).

I.4.2. Antioxydants naturels

Les antioxydants naturels proviennent principalement de plantes sous forme de composés phénoliques (flavonoïdes, acides phénoliques et les alcools, stilbènes, tocophérols, tocotriénols) l'acide ascorbique et les caroténoïdes. La quête d'antioxydants naturels pour l'alimentation, les utilisations cosmétiques et pharmaceutiques sont devenues un enjeu industriel majeur de la recherche scientifique au cours des deux dernières décennies. Les efforts visant à acquérir des connaissances approfondies sur le pouvoir d'antioxydants à partir de plantes et d'exploiter leurs potentiels sont donc en augmentation (Shahin, 2008).

I.5. Stress oxydant et diabète

Plusieurs littératures existent sur les corrélations entre stress oxydant et diabète.

- le stress oxydatif joue un rôle important dans le développement des complications vasculaires du diabète, en particulier du diabète du type II (Giacco et Brownlee, 2010).
- Il a été suggéré que l'augmentation des niveaux de radicaux libres est un important déclencheur de résistance à l'insuline. La signalisation de l'insuline est modulée par les ROS/RNS de deux façons. D'une part, en réponse à l'insuline, les ROS/RNS sont produits pour exercer leur pleine fonction physiologique et d'autre part, les ROS et les RNS ont une régulation négative sur la signalisation de l'insuline, les interprétant pour développer une résistance à l'insuline qui est un facteur de risque pour le diabète de type II (Ullah *et al.*, 2016).

- De nombreuses preuves issues d'expériences ont établi un lien entre le diabète et le stress oxydatif en mesurant différents biomarqueurs, notamment les biomarqueurs de dommages à l'ADN et les produits de peroxydation des lipides. On pense que dans l'apparition et la progression des complications tardives du diabète, les radicaux libres jouent un rôle majeur en raison de leur capacité à endommager les lipides, les protéines et l'ADN (Ullah *et al.*, 2016).
- La variation des niveaux de ces enzymes : CAT (enzymatique/non enzymatique), la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GSH-Px), rend les tissus sensibles au stress oxydatif, ce qui entraîne le développement de complications diabétiques (les maladies des artères coronaires, la neuropathie, la néphropathie, la rétinopathie et les accidents vasculaires cérébraux) (Giacco et Brownlee, 2010).
- Des expériences conduites *in vitro* et *in vivo* ont établi que l'hyperglycémie induit, de manière générale, un dysfonctionnement endothélial. Ce dysfonctionnement endothélial peut être prévenu par l'administration d'antioxydants, ce qui suggère un rôle essentiel des agents redox du stress oxydatif dans la réduction du niveau de glucose sanguin (Ullah *et al.*, 2016).

Limiter la production des radicaux libres représente donc un objectif thérapeutique de premier ordre pour l'équilibre glycémique.

II. PARTIE EXPERIMENTALE

II.1. Matériel végétal

La sélection du matériel végétal est la première étape dans une étude phytochimique. Du soin avec lequel elle sera réalisée dépend en grande partie le succès du travail entrepris par la suite. Le choix des plantes présentant le plus d'intérêt pour répondre à nos objectifs, a débuté par un criblage sur six plantes spontanées locales de la région de Laghouat, acheter de chez un herboriste à Aflou (110 Km du chef-lieu de la wilaya de Laghouat) en décembre 2017 (Tableau II.1). L'assortiment de ces plantes est basé sur des données ethnopharmacologiques indiquant leur utilisation contre certaines maladies notamment le diabète ainsi que la nouveauté de leur étude. Aussi la sélection convient avec soin les plantes pouvant présenter un intérêt sur la base de trois critères :

- ✓ Leur fréquence de citation
 - ✓ Leur endémisme
 - ✓ Le fait qu'elles soient peu ou pas étudiées
- ❖ Plante spontanée, a une utilisation vernaculaire a une échelle local, peu connue et a une étude de point de vue activité biologique très réduite : ***Linaria aegyptiaca* (Scrophulariaceae)**
 - ❖ Plantes médicinales antidiabétiques : ***Ammodaucus leucotrichus* (Apiaceae), *Cistanche tinctoria* (Orobanchaceae) et *Bubonium graveolens* (Asteraceae).**
 - ❖ Plantes médicinales non antidiabétiques, connue pour leur utilisation en thérapie traditionnelle : ***Asphodelus microcarpus* (Liliaceae), *Haplophyllum tuberculatum* (Rutaceae).**

Tableau II.1. Systématique, description, utilisation et principes actifs des plantes choisis pour le criblage.

Ammodaucus leucotrichus	
Systématique	Photo
Régne : plantae	
Embranchement : Angiospermes	
Classe : Eudicots	
Sous classe : Astéridées	
Ordre : Apiales	
Famille : Apiacée	
Genre : Ammodaucus	
Espèce : Ammodaucus leucotrichus	
Nom français : Cumin velu	
(Chehma, 2006)	
Nom arabe : أم دريقة	
Description botanique	
Ammodaucus leucotrichus est une plante glabre, annuelle, à tiges dressées, rameuses, finement striées, feuilles très divisées, à lanières étroites, un peu charnues; ombelles à 2 - 4 rayons, involucre à bractées très divisées et petites; fruits très velus, portant de longs poils crépus, jaune-roux à la base, puis blancs, et longs de 8 à10 mm. Assez commun dans tout le Sahara (Ozenda, 1991).	
Utilisation en médecine traditionnelle	
Plante très prisée pour ces qualités aromatiques et médicinales • Pharmacopée : Elle est utilisée, en poudre ou en infusions pour soigner les maux d'estomac, les troubles digestifs et les vomissements, mais sert aussi contre les allergies et les palpitations. • Alimentation : Elle peut être utilisée pour aromatiser le thé et redonner de l'appétit. • Intérêt pastoral : Plante peu broutée par les dromadaires, indicatrice de surpâturage (Chehma, 2006)	
Principes actifs	
Cette plante est très riche en huiles essentielles, flavonoïdes, tanins condensés et hydrolysables, coumarines, alcaloïdes et terpénoïdes (Ziani <i>et al.</i>, 2019).	

<i>Asphodelus microcarpus</i>	
Systématique	Photo
Régne : plantae	
Embranchement : Spermaphyta	
Classe : Monocotylédones	
Ordre : liliiflorae	
Famille : liliaceae	
Genre : Asphodelus	
Espèce: <i>Asphodelus microcarpus</i>	
Nom arabe : البرواق	
Description botanique	
<i>Asphodelus microcarpus</i> est une plante avec des fleurs blanches ou carnées, de 15 mm de long max. tépales carénés, à carène verte ou pourpre. Capsule de 6-14 mm de long, oblongues, ovoïde ou subglobuleuse ; à valves nettement ridées transversalement sur sec-forets, pasturages (Quézel, 1962) <i>Asphodelus microcarpus</i> Salzm. et Viy (Asphodelaceae) est une herbe robuste avec des racines de plusieurs tubercules en forme de fuseau, largement répandu dans la région méditerranéenne côtière (Ghoneima et al, 2013), elle est anciennement placé dans la famille des lis (Liliaceae).	
Utilisation en médecine traditionnelle	
Il est largement utilisé dans la médecine traditionnelle en Algérie (Kaddem,1990) Plusieurs chercheurs ont mentionné que cette plante est traditionnellement utilisée pour traiter de nombreuses maladies telles que Polyarthrite rhumatoïde, bronchite et asthme (Chermat and Gharzouli, 2015), douleur auriculaire (Zellagui et al., 2013) diurétique, otite et mal de dents (Sarri et al., 2014) des maladies pulmonaires (Al Kayali et al., 2016).	
Principes actifs	
Les racines contiennent principalement des dérivés anthraquinoniques tels que le chrysophanol, l'aloë-emodine, des triterpénoïdes et des dérivés naphthaléniques. Les parties aériennes ont surtout montré la présence de flavonoïdes tels que la lutéoline, l'isovitexine, l'isoorientine, des acides phénoliques et quelques anthraquinones. Des acides gras, à savoir myristique, palmitique, oléique, linoléique et linolénique, ont été trouvés dans les graines et les racines (Mayouf et al., 2019).	

Bubonium graveolens	
Systématique	Photo
Régne : plantae	
Embranchement : racheophyta	
Classe : Magnoliopsida	
Ordre : Asterales	
Famille : Asteraceae	
Genre : Asteriscus	
Espèce: Bubonium graveolens	
Nom arabe : الطفس	
Description botanique	
Capitules hétérogames, multiflores, radiés. Fleurs du rayon femelles, ligulées, sur 1-2 rangs, à corolle triquètre; celles du disque tubuleuses et hennaphrodites. Involucre hémisphérique ou campanulé, à bractées sur peu de rangs, double; l'extérieur foliacé et dépassant les ligules, induré à maturité. Réceptacle paléacé, à paillettes embrassant les fleurs. Akènes dimorphes; ceux du rayon non ailés (différence avec <i>PaZZenis</i>), triquêtres, ceux du disque obconiques; tous avec une aigrette fonnée de quelques paillettes libres, un peu inégales, denticulées ou laciniées à Fleurs jaunes (Quézel, 1962)	
Utilisation en médecine traditionnelle	
la famille des Asteraceae comprenant environ 25.000 espèces. L'espèce la plus répandue est Asteriscus graveolens (Forssk) qui possèdent un effet immunostimulant largement utilisé dans la médecine populaire pour traiter fièvre, le tractus gastro-intestinal et la bronchite ou comme agent anti-inflammatoire. Récemment, il était utilisé comme fongicide botanique (Ramdane et al, 2017)	
Principes actifs	
Le genre Asteriscus est caractérisé par une teneur élevée en flavonoïdes, sesquiterpènes, bisabolone et hydroperoxydes et phénols (Ramdane et al., 2017)	

<i>Cistanche tinctoria L</i>	
Systématique	Photo
Régne : plantae	
Embranchement : Spermatophyta	
Classe : Eudicots	
Sous classe : Astéridées	
Ordre : Lamiales	
Famille : Orobanchaceae	
Genre : Cistanche	
Espèce : <i>Cistanche tinctoria L</i>	
Nom français : cistanche	
Nom arabe : الدانون	
Description botanique	
Parasite sur Chénopodiacées, plus rarement sur les Tamarix , c’est une plante puissante de 3 à 12 dm ,aux tiges souvent en touffes. Les fleurs, ainsi que toute la plante sont jaunes . Le tube de la corolle s’évase brusquement au-dessus de l’insertion des étamines (Ozenda, 2004)	
Utilisation en médecine traditionnelle	
En tant que plante médicinale traditionnelle rare, la plante entière séchée est utilisée pour le traitement des douleurs abdominales, de la diarrhée, des contractions musculaires, des contusions, des maladies gynécologiques ; stimulant de la lactation et du diabète. Non information n'a été trouvée sur les propriétés pharmacologiques de cette plante, tandis qu'une recherche sur sa toxicité s'avère négative (Bouzitouna <i>et al.</i>, 2015)	

<i>Haplophyllum tuberculatum</i>	
Systématique	Photo
Régne : plantae	 Photo: A. CHEHMA
Embranchement : Tracheophyta	
Classe : Magnoliopsida	
Ordre : Sapindales	
Famille : Rutaceae	
Genre : <i>Ruta</i>	
Espèce: <i>Haplophyllum tuberculatum</i>	
Nom arabe : الفيجل	(Chehma, 2006)
Description botanique	
<i>Haplophyllum tuberculatum</i> est une herbe à tiges de 30 à 60 cm, très rameuses dans leur partie supérieure avec des feuilles lancéolées ou souvent très allongées (en apparence fasciculées par suite du développement des feuilles du bourgeon axillaire), enroulées endessous par leurs bords, à face supérieure couverte ainsi que la tige de pustules sécrétant une essence extrêmement malodorante; fleurs petites en corymbe au sommet de la tige, à quatre pétales jaunes, huit étamines et quatre carpelles donnant une capsule (Ozenda, 1991)	
Utilisation en médecine traditionnelle	
<i>Haplophyllum tuberculatum</i> était traditionnellement utilisé en Algérie pour de nombreuses maladies comme antiseptique, pour blessures et ulcères, comme calmant, hypnotique neurologique, pour l'infertilité, le diabète, les ballonnements, la fièvre, les maladies du foie, otite, rhumatisme, comme vermifuge, pour l'obésité, la constipation, le côlon, la diarrhée, les gaz, l'hypertension, les douleurs menstruelles, maladie cardiaque, piqûres de scorpion, grippe, vomissements, inflammation de la gorge, amygdalite, toux et perte d'appétit.	
Principes actifs	
Les études phytochimiques menées sur ces espèces caractérisent la présence d'acides aminés, de saponines, d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de coumarins, de tanins, d'huile volatile, de glycosides, de stérols et de triterpènes (Haddouchi <i>et al.</i>, 2013)	

Linaria aegyptiaca	
Systématique	Photo
Régne : plantae	
Sous - règne: Tracheobionta	
embranchement : Magnoliophyta	
Classe : Mgnoliopsida	
Ordre : Asteridea	
Famille : Scrophulariaceae	
Genre : Linaria	
Espèce: Linaria aegyptiaca	
Nom arabe : الزهيدة	
Description botanique	
Les plantes de ce genre sont annuelles ou vivaces, parfois ligneuses. Elles ne diffèrent que par la corolle éperonnée à la base (Quezel <i>et al</i>,1963). L’espèce <i>aegyptiaca</i>, sujet de notre travail, est un petit buisson à nombreux rameaux (Ozenda,1991), dressés en général, très ramifiés, spinescents au sommet. C'est une plante vivace, finement pubescente (Quezelet al 1963), très variable dont on a distingué diverses formes différant notamment par des caractères de pilosité (Ozenda,1991). Les feuilles sont très petites de moins de 1 cm, hastées ou lancéolées, avec une couleur verte grisâtre ou jaunâtre Les fleurs sont jaunes de 12 à 15 mm. (Quezel <i>et al</i>, 1963).	
Utilisation en médecine traditionnelle	
Il en ressort que la plupart des espèces constituant le genre <i>Linaria</i> sont utilisées en médecine traditionnelle pour leurs diverses propriétés: laxative, spasmolytique et anti-inflammatoire, cholagogue, antirhume (Handjieva, 1993)	
Principes actifs	
L’étude chimique effectuée sur cette espèce a mis en évidence l’isolement et l’identification de divers métabolites secondaires, composés essentiellement de: flavonoïdes, alcaloïdes, diterpénoïdes et iridoïdes (Ferhat, 2012)	

II.2. Préparation des extraits

Le choix de telle ou telle partie dépend de l'espèce de plante utilisée et parfois de l'effet escompté. Généralement, les principes actifs de la plante sont concentrés dans les parties aériennes confrontées aux conditions climatiques : c'est alors celles-ci que nous avons utilisé. Cependant pour la plante *Asphodelus microcarpus* nous avons utilisé les deux parties aériennes et racinaires (tubercules) ; car d'une part les tubercules sont la partie utilisée de cette plante par la population locale pour ses effets thérapeutiques notamment sur les otites et d'autre part aucune étude de l'effet inhibiteur vis-à-vis de l' α -amylase n'a été entreprise sur les tubercules de cette plante.

II.2.1. Extraction aqueuse

Après acquisition des six plantes de chez l'herboriste, les échantillons ont été rendu en poudre finé et tamisées à la même granulométrie 10 nm puis conservées jusqu'à leur utilisation. En supposant que les ingrédients actifs sont des composés polaires, l'extraction a été réalisée avec de l'eau distillée. L'extrait aqueux a été préparé par décoction (tisanes) en imitant ainsi l'utilisation habituelle des plantes médicinales.

Une masse de 5 g de chaque poudre végétale a été placée dans 100 mL d'eau distillée, le tout a subi un chauffage pendant 20 minutes à 75 °C. L'extrait a été filtré et évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45 °C. Le résidu sec a été dissous dans 10 ml d'eau distillée et maintenu à 4 °C jusqu'à analyse.

II.2.2. Extraction organique

Nous avons sélectionné par la suite trois de ces plantes pour étudier leurs compositions phytochimiques ; afin de développer, d'expliquer et d'approfondir les connaissances sur certaines de leurs activités biologiques ; notamment leur effets inhibiteurs, et dans un but de tenter l'isolement des molécules responsables à cette activité.

La sélection revient aux plantes dont les extraits aqueux ont montré une activité importante vis-à-vis de l' α -amylase. Ainsi, les espèces retenues sont : *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens* et *Haplophyllum tuberculatum*,

Pour ce faire, nous avons procuré de nouveaux échantillons des trois plantes citées précédemment. La récolte, a été effectuée dans des endroits propres, aéré et loin de tout impact de pollution.

La plante *Asphodelus microcarpus* a été récolté à « Oued Morra », situé à environ 89,5 Km du chef-lieu de la wilaya de Laghouat durant le mois d'Avril 2019, la deuxième plante *Bubonium graveolens* a été récolté à « Zalfana », situé à environ 70 Km du chef-lieu de Ghardaïa, durant le mois d'Avril 2019, alors que la plante *Haplophyllum tuberculatum* a été récolté à Bennasser Benchohra (ou Bennacer Benchohra), anciennement Mekhareg, situé à environ 18 Km du chef-lieu de la wilaya de Laghouat durant le mois d'Avril 2019.

Après la récolte, les plantes ont été identifiées par Pr Yousfi Mohamed avec la contribution des membres du laboratoire des sciences fondamentales de l'Université Amar Telidji de Laghouat.

Après nettoyage du matériel végétal, les échantillons ont été séchés à l'ombre dans une pièce propre et loin de l'humidité. Après séchage total, les parties végétales ont été broyées manuellement à l'aide d'un mortier et tamisées à la même granulométrie puis conservées jusqu'à leur analyse.

II.2.2.1. Tests phytochimiques

Avant toute extraction, nous avons effectué des tests phytochimiques sur les poudres des trois plantes; afin d'identifier l'existence des métabolites que nous avons désiré d'extraire.

❖ Test des flavonoïdes

Une masse de 0.5 g de la poudre végétale, a été macérée dans 5 ml de méthanol pendant 24 H, après filtration 2 ml de $AlCl_3$ ont été ajouté à 1 ml du filtrat. L'apparition d'une couleur jaune foncé nous a indiqué la présence des flavonoïdes (Quettier, 2000).

❖ Test des saponines

Une masse de 1 g de la poudre végétale, a été chauffée dans 100 ml d'eau distillée jusqu'à ébullition, après refroidissement la solution a été filtrée puis agitée, l'apparition d'une mousse stable pendant 15 min nous a indiqué la présence des saponines (Mojab *et al.*, 2003).

❖ Test des alcaloïdes

Une quantité de 1 g de chaque poudre végétale, a été macérée dans 20 ml d'éthanol absolu pendant une nuit. Après filtration, le mélange a été évaporé à sec à l'aide d'un rotavapeur et le résidu a été solubilisé dans 5 ml d'acide chlorhydrique 2 N, puis chauffé dans un bain marie à 100 °C pendant 5 min. Après refroidissement et filtration, quelques gouttes du réactif de

Mayer ont été ajouté à quelques millilitres du filtrat. L'apparition d'une turbidité ou d'un précipité blanc nous a indiqué la présence des alcaloïdes (Chhetri *et al.*, 2008)

Après l'accomplissement des tests phytochimiques, les poudres des trois plantes sélectionnées ont été soumise à trois extractions organiques des métabolites secondaires classiques : composés phénoliques, alcaloïdes et composés terpéniques (huiles essentielles) ; dont le but été de cerner la classe métabolique responsable de l'effet inhibiteur vis-à-vis de l' α -amylase.

II.2.2.2. Extraction des composés phénoliques

L'extraction solide-liquide est une méthode utilisée pour extraire les composés phénoliques du matériel végétal. Cette méthode est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire ou de séparer par dissolution dans un liquide un ou plusieurs composants à un partir d'un solide (Velickovic *et al.*, 2006).

Le Méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'eau, l'acétate d'éthyle et, dans une moindre mesure, le propanol, le diméthylformamide, et leurs combinaisons sont fréquemment utilisés pour l'extraction des composés phénoliques (Naczki et Shahidi, 2004).

Dans la présente étude, l'extraction a été réalisée selon le protocole décrit par Khacheba et ces collègues (Khachba *et al.*, 2016), avec de légères modifications (dans la masse de la poudre et la durée d'extraction) selon trois étapes : macération, dépigmentation et purification.

A. Macération

Cinq grammes de chaque poudre précédemment obtenue a été macérée dans 100 ml d'un mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau) (80/20 : V/V) pendant 24 heures à température ambiante et à l'obscurité. L'extrait à été filtré puis le résidu est repris pour une deuxième extraction avec un même volume de 100 ml d'un même mélange hydro-alcoolique pendant 24 heures à température ambiante et dans l'obscurité, ce qui nous a donc permis d'obtenir l'extrait hydro-alcoolique brut (khacheba *et al.*, 2016).

B. Dépigmentation

L'extrait brut est évaporé sous pression réduite à 50°C, puis la phase aqueuse restante est lavée une ou plusieurs fois avec un même volume d'hexane, jusqu'à l'épuisement des pigments.

C. Purification

La phase aqueuse ainsi obtenue est ensuite lavée dans une ampoule à décanter une ou plusieurs fois avec un même volume de l'acétate d'éthyle, Les extraits organiques ainsi obtenus sont séchés avec du sodium anhydre puis évaporés à sec à pression réduite à 50°C. Les résidus secs sont repris dans 10 ml de méthanol pur donnant la fraction phénolique correctement purifiée et conservée au réfrigérateur à 4 °C jusqu' à leur analyse.

II.2.2.3. Extraction des alcaloïdes

Après traitement des résultats des tests phytochimiques, une seule plante a montré l'existence d'alcaloïdes : *Haplophyllum tuberculatum*. L'extraction des alcaloïdes a été effectuée sur sa partie aérienne en utilisant la méthode adoptée par Ross et Rain en 1977 in Harborne (1998, modifié) (Benarous et *al.*, 2015).

Pour cela, 5 g de la poudre a été macérée dans 50 ml d'éthanol absolu à température ambiante et à l'obscurité pendant 48 h, après filtration, le filtrat éthanolique est évaporé sous pression réduite à sec dans un rota vapeur à une température de 55°C (Benarous et *al.*, 2015).

Le résidu sec obtenu, a été solubilisé dans 100 ml de chloroforme et mélangé à 50 ml d'acide chlorhydrique 5 % (pH :1), plusieurs lavages ont été effectués par le chloroforme en changeant à chaque fois les 100 ml de chloroforme. L'alcalinisation de la phase aqueuse acide est faite par l'ajout de 50 ml de NH₄OH 25% (pH :10), pour récupérer les alcaloïdes, un second lavage est effectué par le chloroforme qui est par la suite évaporé à sec, sous pression réduite dans le rota vapeur à une température de 55 °C. Le résidu sec, il est repris dans 10 ml d'éthanol absolu et conservé à + 4°C jusqu'aux tests biologiques (Benarous et *al.*, 2015).

II.2.2.4. Extraction des huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger.

Le montage est constitué d'un ballon en verre (de 2 litres) contenant 100 g du matériel végétal (parties aériennes en poudre) additionné d'un litre d'eau, placé au-dessus d'un chauffe ballon. Ce dernier est surmonté d'une colonne qui communique avec un réfrigérant, permettant la condensation des vapeurs d'eau chargées de gouttelettes d'huile essentielle, qui sont ensuite recueillies sous forme de distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide, l'extraction a duré quatre heures.

Les hydrodistillats obtenus sont mesurés (en ml par Kg de plante) et séchés par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer toute trace d'eau. Après les avoir récupérées, les huiles essentielles sont conservées, dans des tubes en verre bien scellés et recouverts d'aluminium, puis placés au réfrigérateur à 4°C (protection contre la chaleur, l'évaporation et la lumière).

- **Le calcul de la teneur en huiles essentielles :** la teneur est définie comme étant la quantité en huiles essentielles extraites (en ml) à partir d'un Kilogramme de plante. Cette teneur est calculée par la formule suivante :

$$T = \frac{V}{m}$$

Où :

T : teneur exprimé (en ml/kg);

V : volume d'huiles essentielles extrait (ml);

m : masse de la matière végétale (Kg).

II.2.2.5. Extraction par solvant à polarité croissante

Après évaluation de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase des extraits des trois métabolites secondaires, (composés phénoliques, alcaloïdes et huiles essentielles), nous avons choisi l'extrait phénolique pour continuer et approfondir l'étude.

Et pour plus de précision et afin de sélectionner la fraction appropriée pour d'éventuels travaux d'isolement et de purification, nous avons adopté une extraction des composés phénoliques par une succession de solvants organiques à polarité croissante.

De cette extraction séquentielle à solvants de polarités croissantes, nous avons voulu faire un fractionnement préalable des composés dans chaque solvant selon le degré de polarité, l'extraction a été réalisée selon le protocole décrit par Loh Su Peng (Loh et Hadira, 2011), avec de légères modifications. Une quantité de 1 g de la poudre de la plante est macérée dans 100 ml d'Hexane à l'obscurité et à température ambiante pendant 24H. L'opération a été répétée plusieurs fois jusqu'à l'épuisement du matériel végétal. L'extrait a été ensuite filtré et le résidu a été repris pour une succession de macérations avec un même volume de Dichlorométhane, d'acetate d'éthyle, d'éthanol et de Méthanol comme décrit précédemment jusqu'à l'épuisement.

Après filtration, les extraits organiques ainsi obtenus sont évaporés à sec sous pression réduite à 40°C. Les résidus secs sont repris dans 10 ml de méthanol et conservés au réfrigérateur jusqu'à leur analyse.

II.3. Analyses phytochimiques des extraits

II.3.1. Quantification des phénols totaux

La quantité en phénols totaux dans tout les échantillons (aqueux, phénoliques et par solvants à polarité croissante) a été déterminée avec le réactif Folin-Ciocalteu commercial en suivant la méthode adaptée par Singleton et Ross (1965) (Singleton *et al.*, 1999). En milieu basique, Le réactif de Folin qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungestique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite, dont l'absorption maximale à 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux.

À l'aide d'une micropipette un volume de 100 μ l de chaque solution diluée est mis dans un tube auquel est ajouté 500 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois diluée). Après 2 min d'incubation, 2 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2 % sont ajoutés. Les tubes sont ensuite agités et placés dans l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution préparée est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de type Shimadzu 1601, à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc ne contenant pas d'extrait.

À noter que les extraits ont été dilués pour obtenir une absorbance finale comprise entre 0,1 et 1.

Une courbe d'étalonnage de l'acide gallique, a été réalisée en suivant la même procédure décrite précédemment.

II.3.2. Quantification des flavonoïdes

Les teneurs des flavonoïdes ont été mesurées par une méthode adaptée de Lamaison et Carnat (1991) (Bahorun, 1997), en utilisant le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) comme réactif. Ce dernier a la capacité de se complexer avec les oxygènes des groupements hydroxyles des flavonoïdes, produisant ainsi un complexe de couleur jaune, dont l'absorbance maximale est enregistrée à 409 nm.

Un volume d'un ml de chaque solution diluée a été placé dans un tube à essai suivi par l'addition d'un ml d'une solution méthanolique de trichlorure d'aluminium à 2 %. Les tubes sont ensuite agités légèrement et incubés dans l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution préparée a été mesurée dans le même spectrophotomètre à une longueur d'onde de 409 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage de la quercétine, a été réalisée en suivant la même procédure décrite précédemment.

II.4. Effets d'inhibition des extraits vis-à-vis de l' α - amylase

Un bon nombre de plantes sont connues pour exercer leur activité anti - hyperglycémiant via l'inhibition des enzymes hydrolysants les glucides. C'est pourquoi les inhibiteurs naturels des enzymes digestives à partir de sources végétales, ont offert une stratégie intéressante pour le contrôle de l'hyperglycémie.

Les polyphénols végétaux sont connus pour inhiber l'activité des enzymes digestifs parmi lequel figure l' α - amylase et par conséquent, ont le potentiel de contribuer à la gestion du diabète de type II.

Dans ce concept, et par le biais de cette étude, nous avons procédé à l'évaluation de l'effet de nos extraits sur l'une des hydrolases responsables de la digestion des sucres à savoir l' α - amylase ; en s'intéressant à l'évaluation des capacités des agents phénoliques de nos extraits pour inhiber l'activité enzymatique de l'enzyme en question.

Les α - amylases ont la capacité d'hydrolyser les liaisons de types α - (1,4) à l'intérieur des chaînes d'amidon. Ce sont donc des endoenzymes. Elles existent dans le règne animal, végétal et microbien. Elles apparaissent au cours de la germination des céréales. Elles sont aussi présentes dans la salive et dans le suc pancréatique.

Dans notre étude la mesure de l'activité enzymatique revient à un dosage spectrophotométrique direct du substrat dégradé et indirect du produit libéré par unité de temps lors de l'hydrolyse du substrat par l' α - amylase, dans des conditions opératoires bien définies.

II.4.1. Effets d'inhibition des extraits aqueux

Avant de procéder à l'étude de l'activité anti - amylasique de nos plantes, nous avons fait subir leurs extraits aqueux à des tests d'inhibition question de juger leur potentiels inhibiteurs vis - à - vis d'une α - amylase fongique : *Aspergillus oryzae*, c'est - à - dire l'étude de leurs comportements sur l'activité de l'enzyme en question (augmentation ou diminution) et le pourcentage d'inhibition qu'ils pouvaient atteindre.

L'activité enzymatique de l' α - amylase est dosée sur son substrat l'amidon (mélange de 2 homopolymères, l'amylose et l'amylopectine composés d'unités de molécules de D - Glucose). Elle catalyse l'hydrolyse de ce substrat qui libère le maltose et d'autres produits (Figure II.1). Le maltose libéré est dosé spectrophotométriquement.

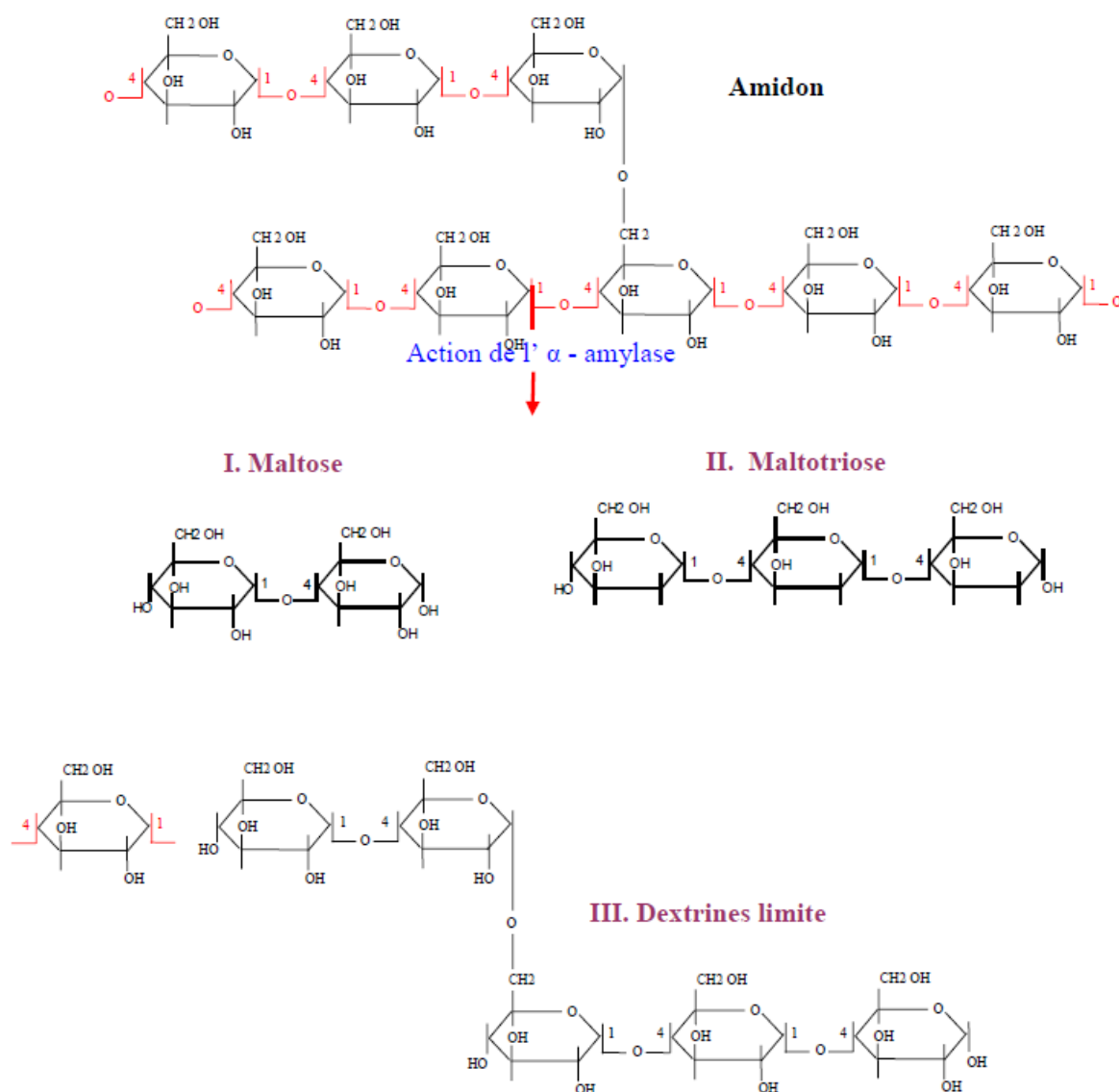


Figure II.1. Schéma réactionnel de l'action de l' α -amylase sur l'amidon comme substrats (khacheba, 2014)

L'analyse des inhibiteurs de l' α – amylase a été effectuée par la quantification du sucre réducteur (le maltose) libéré dans le milieu réactionnel Figure II.1. L'activité enzymatique de l'enzyme est exprimée par la diminution des unités de maltose libérées par unité de temps lors de l'hydrolyse du substrat (amidon), dans des conditions de températures et de pH favorables.

La méthode suivie est celle de Bernfeld (1955) (Miller *et al.*, 1959), en utilisant le dinitrosalicylique DNS comme réactif. Le DNS qui stoppe réaction enzymatique par un une modification du pH et forme un complexe avec le maltose.

Cette méthode teste la présence d'un groupe carbonyle libre ($C = O$) des sucres dits réducteurs. Ceci implique l'oxydation du groupe fonctionnel présent dans le maltose, Simultanément, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) est réduit à l'acide 5-nitrosalicylique 3-amino dans des conditions alcalines.

Chaque molécule de maltose (une liaison hydrolysée) libérée dans le milieu réactionnel, réagit avec le DNS en excès de couleur orange entraînant une réduction de ce dernier, induisant en parallèle un changement de couleur en rouge brique dont l'intensité est mesurée après dilution à 530 nm.

Dans des tubes à essais les milieux réactionnels contenaient 100 μ L d'une solution d'amidon à 1 %, 100 μ L d'un tampon phosphate salé (pH 7) et 100 μ l de chaque extrait aqueux dilué à la même concentration pour des raisons de comparaison. Les tubes ont été ensuite incubée pendant 10 minutes à 37 °C, il s'en suit l'ajout des 100 μ l de l'enzyme (13 U/ml : une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une micromole de maltose par minute dans les conditions de l'essai) suivie d'une incubation pendant une durée de 10 min à 37 °C. La réaction enzymatique a été stoppée par l'ajout du DNS, le milieu réactionnel a été ensuite porté à ébullition à 100 °C pendant 5 min, après refroidissement le milieu réactionnel a été dilué en ajoutant 4 ml d'eau distillée. Les absorbances sont ensuite mesurées à 530 nm contre un blanc approprié pour chaque échantillon. Un contrôle a été préparé de la même façon sans inhibiteur.

L'activité inhibitrice de chaque extrait est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Échantillon du test}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

Où :

$A_{\text{Contrôle}}$: Densité optique du contrôle ou témoin.

$A_{\text{Échantillon du test}}$: Densité optique de l'échantillon avec inhibiteur.

II.4.2. Effets d'inhibition des extraits des trois métabolites secondaires (composés phénoliques, alcaloïdes et huiles essentielles)

L'activité inhibitrice confirmée par le test précédant, nous a incité à varier le type d'extraction et la méthode d'évaluation de l'activité inhibitrice (réactif) en vue de déterminer la classe métabolique responsable de l'activité anti - amylasique.

Trois extraits des métabolites secondaires classiques (composés phénoliques, alcaloïdes et huiles essentielles) ont été préparés.

Et deux méthodes ont été adoptées pour évaluer l'activité inhibitrice : test au DNS et test à la néocuproïne.

L'étude de l'activité anti - amylasique revient à la détermination pour chaque extrait le paramètre IC₅₀. Pour cela, il est été nécessaire de varier la concentration en extraits.

❖ Test au DNS :

- Pour les extraits phénoliques et alcaloïdiques

L'activité inhibitrice des extraits a été mesurée comme décrit précédemment en introduisant 100 µl des différentes concentrations variables d'extraits.

- Pour les huiles essentielles

Dans des tubes à essais les milieux réactionnels contenaient 100 µL d'enzyme et 100 µL de chaque extrait d'huile essentielle dilué. Les tubes ont été ensuite incubée pendant 5 minutes à 37 °C, il s'en suit l'ajout d'une solution d'amidon à 1 %, suivie d'une incubation pendant une durée de 10 min à 37 °C. La réaction enzymatique a été stoppée par l'ajout du DNS, le milieu réactionnel a été ensuite porté à ébullition à 100 °C pendant 5 min, après refroidissement le milieu réactionnel a été dilué en ajoutant 2 ml d'eau distillée. Les absorbances sont ensuite mesurées à 530 nm contre un blanc approprié pour chaque échantillon. L'enzyme non inhibée est pris comme contrôle.

❖ Test à la neocuproïne :

Dans ce cas la mesure de l'activité enzymatique revient également à un dosage spectrophotométrique indirect du produit le maltose libéré par unité de temps lors de l'hydrolyse du substrat l'amidon par l' α - amylase fongique d'*Aspergillus oryzae*, dans des conditions opératoires bien définies. L'activité inhibitrice de l' α -amylase fongique a été

déterminée selon une méthode de la littérature (Dygart *et al*, 1965), sur son substrat d'amidon en utilisant la néocuproïne comme réactif.

La méthode est basée sur le pouvoir réducteur du produit, le maltose car le carbone 1 porteur le OH hémiacétalique plus réactif que les autres OH de son glucose terminal ne participe pas à la liaison α (1 - 4). Chaque maltose libéré (une liaison hydrolysée) réagit avec une solution basique de la glycine cuivrique de couleur bleue, en développant une coloration jaune-orangé en présence de la néocuproïne. Cette coloration est mesurable à 450 nm et son intensité est proportionnelle à la quantité du produit libéré.

Pour cela, dans un tube à essai, un volume de 200 μ L de tampon de phosphate salé (pH 7) est mélangé avec 100 μ L d'amidon soluble (0,05%) et 100 μ L d'extraits dilué dans le même tampon. Après avoir soigneusement mélangé, les tubes d'échantillons et des blancs ont été préincubé à 37°C pendant 10 min ; puis la réaction est déclenchée par l'ajout de 100 μ L d' α -amylase de (13 U/ml).

Après incubation à 37 °C pendant 5 minutes, la réaction a été stoppée par l'ajout de 1 ml d'une solution A qui est un mélange de 3 composés : la glycine, le Na_2CO_3 et le CuSO_4 de pH 10 et 1 ml d'une solution B qui est une solution de néocuproïne. Le milieu réactionnel a été agité vigoureusement, puis porté à ébullition pendant 10 minutes. À leur sortie du bain, les tubes ont été refroidis dans de l'eau de robinet (à température ambiante). Le maltose réduit la solution A de couleur bleue en un complexe jaune orangé en présence de la solution B (incolore) dont l'absorption maximale est à 450 nm. La lecture de l'absorbance de chaque solution préparée a été enregistrée contre un blanc. Les valeurs de densité optique ainsi obtenues, nous ont permis de calculer l'activité inhibitrice de chaque extrait en utilisant la même formule précédente.

La représentation graphique de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en extraits, nous a permis de déterminer les valeurs d'IC₅₀ pour chaque extrait.

La concentration inhibitrice provoquant 50% d'inhibition (IC₅₀), est une mesure de l'efficacité d'un composé à l'inhibition d'une fonction biologique ou biochimique. Cette mesure quantitative indique combien cette substance inhibitrice est nécessaire pour inhiber un processus biologique donné (ou un composant d'un processus, c'est à dire une enzyme

cellulaire, un récepteur des cellules ou micro-organismes) de moitié. Dans notre cas la valeur de l'IC₅₀ représente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse réactionnelle jusqu'à 50% de sa valeur maximale non – inhibée. Cependant une valeur d'IC₅₀ toute seule ne permet pas de tirer des conclusions mécanistiques, mais peut être utilisée comme indice d'efficacité d'inhibition par rapport à d'autres inhibiteurs si les valeurs d'IC₅₀ sont déterminées dans les mêmes conditions réactionnelles (Keillor, 2004).

II.4.3. Effets d'inhibition des extraits organiques à polarité croissante

Après analyse des résultats des IC₅₀ des extraits de métabolites secondaires, les extraits phénoliques se sont montrés les plus efficaces en terme d'inhibition vis-à-vis de l'α – amylase.

Ainsi nous avons varié le type de solvant d'extraction et l'origine de l'enzyme en vue de déterminer la fraction responsable de l'activité anti - amylasique.

Cinq solvants à polarité croissante ont été utilisés (Hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol et méthanol).

L'évaluation de l'activité inhibitrice, a été effectuée en utilisant deux amylases d'origine différente pour des raisons de confirmation et de comparaison qui sont celle fongique d'*Aspergillus oryzae* et salivaire humaine et pour lesquelles deux tests ont été adoptés selon l'enzyme en question : test au DNS et test CNPM3

Avant de procéder à l'étude de l'activité inhibitrice de nos extraits vis-à-vis des deux enzymes, nous avons fait subir ces derniers à des tests d'inhibition question de juger leur potentiels inhibiteurs, c'est - à - dire l'étude de leurs comportements sur l'activité enzymatique de l'α - amylase (augmentation ou diminution) et le pourcentage d'inhibition qu'ils pouvaient atteindre.

Après avoir enregistré un effet inhibiteur par le test précédent, nous avons varié les concentrations en inhibiteur pour chaque extrait afin de déterminer le paramètre IC₅₀.

Nous avons également, mesuré le pouvoir anti - amylasique par la même procédure pour trois molécules flavonoïdiques pures : la Quercétine, la rutine et la catéchine, ainsi qu'un antioxydant de synthèse : le BHA et le médicament le plus prescrit pour les diabétiques locaux Gluconova; pour des raisons de comparaison.

❖ Test au DNS :

L'activité inhibitrice des extraits a été mesurée sur l' α - amylase fongique comme décrit précédemment en introduisant 100 μ l des différentes concentrations variables d'extraits.

❖ Test au CNPM3 :

Dans ce cas, la mesure de l'activité enzymatique revient à un dosage spectrophotométrique direct du produit coloré libéré par unité de temps, lors de l'hydrolyse du substrat par les deux enzymes fongique et salivaire ; dans des conditions opératoires bien définies. L'activité inhibitrice a été déterminée selon une méthode de la littérature (Niat *et al*, 2020), en utilisant le 2 - Chloro - 4 - nitrophényl - α - D - maltotrioside (CNPM3) comme substrat.

La méthode est basée sur la mesure de l'absorbance du produit libéré suite à l'hydrolyse du substrat 2 - Chloro - 4 - nitrophényl - α - D - maltotrioside. Après hydrolyse du 2 - Chloro - 4 - nitrophényl - α - D - maltotrioside par l' α - amylase les produits suivant sont libérés : le 2 - Chloro - 4 - nitrophénol, le maltoriose et le glucose. Dans cette étude, nous nous intéressons à suivre l'apparition du produit 2-Chloro-4-nitrophénol de couleur jaune en suivant l'évolution de son absorbance à 405 nm (Figure III.1.).

Pour cela, dans un tube à essai, 140 μ l de l'extrait est mélangé à 20 μ l d'enzyme diluée dans un tampon phosphate salé (pH 7) après une incubation pendant 15 min à 37°C, 1ml du substrat (1 g/l) a été ajouté, le mélange réactionnel a été ensuite placé à 37°C pendant 3 min. L'absorption du produit de la réaction, de couleur jaune (2 - Chloro - 4 - nitrophénol) est immédiatement mesuré à 405 nm. Les contrôles négatifs sont également effectués pour vérifier l'activité avec et sans inhibiteur. L'activité inhibitrice de chaque extrait est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Échantillon du test}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

Où :

$A_{\text{Contrôle}}$: Densité optique du contrôle ou témoin.

$A_{\text{Échantillon du test}}$: Densité optique de l'échantillon avec inhibiteur.

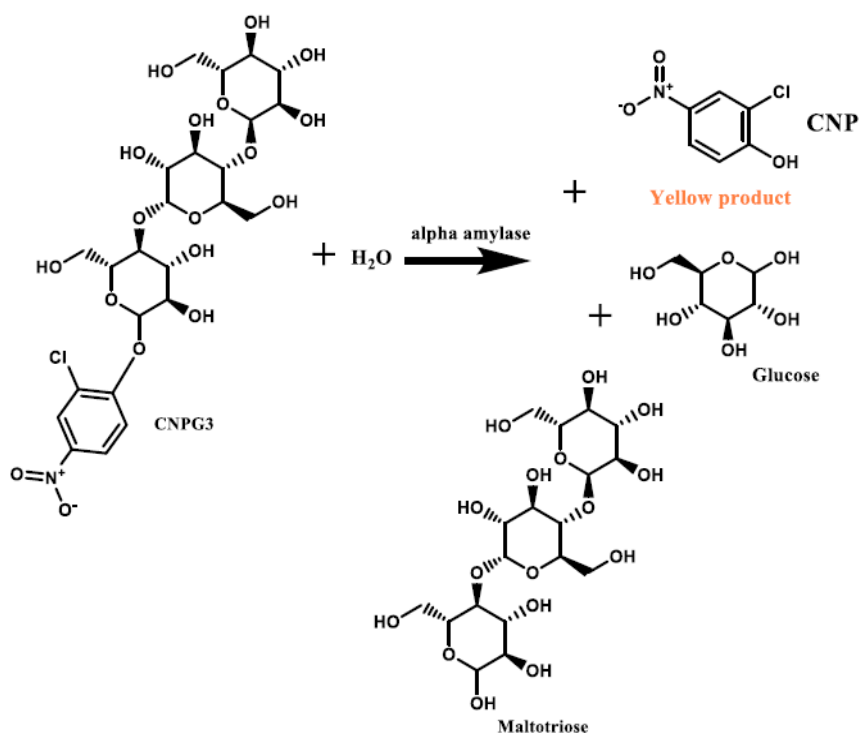


Figure II.2. Schéma illustrant la réaction de l'hydrolyse du α - maltotrioside-2-chloro-4-nitrophényle (CNPM3) par l' α - amylase (Nia *et al.*, 2020).

La représentation graphique de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en extraits, nous a permis de déterminer les valeurs d'IC₅₀ pour chaque extrait.

II.5. Tentative d'isolement

L'utilisation des plantes médicinales dans la médecine moderne souffre du fait que, bien qu'une centaine de plantes soient utilisées dans le monde pour prévenir ou guérir les maladies, les preuves scientifiques en termes de médecine moderne font défaut dans la plupart des cas. Cependant aujourd'hui, il est nécessaire de fournir la preuve scientifique et de justifier l'opportunité de l'utilisation des plantes et de leurs principes actifs (Chabrier, 2010).

Les travaux des ethno-pharmacologues ont mis en relief l'utilisation des plantes médicinales par l'extraction de principes actifs pour l'industrie pharmaceutique. La rationalité industrielle trouve dans cette démarche une base d'innovation pour la mise au point de médicaments nouveaux qui peut être source de gain de temps dans les processus de recherche et développement (Boutefnouchet *et al.*, 2020).

Traditionnellement, les plantes ont été d'excellentes sources de composés produits naturellement avec beaucoup d'effets biologiques. L'activité biologique et la diversité structurelle des composés bioactifs sont incomparables avec toutes les synthèses de criblage disponibles. En tant que tels, ces échafaudages privilégiés servent d'importantes plateformes biologiquement validées pour la conception de bibliothèques de composés dans la recherche de nouveaux médicaments ayant diverses indications pour la santé humaine (Dioguardi *et al.*, 2019).

Un produit à base de plantes contient plusieurs constituants qui pourraient être responsables de ses effets thérapeutiques. Il est donc nécessaire de définir autant de constituants que possible afin de comprendre et d'expliquer la bio activité.

L'élucidation de la structure des polyphénols est difficile en raison de leur caractère hétérogène. La diversité des polyphénols est donnée par la variabilité structurale de leurs squelettes de base avec différents modèles d'hydroxylation des noyaux aromatiques de différentes configurations dans les centres chiraux et stéréochimie. En raison de cette complexité et de cette diversité, la caractérisation des polyphénols reste donc très difficile, et on en sait moins sur la relation structure-activité (Es-Safi, 2012).

Les polyphénols peuvent être séparés, quantifiés et identifiés en une seule opération par couplage HPLC aux rayons ultraviolets (UV), la masse, la résonance (RMN) ou les détecteurs magnétiques nucléaires. Récemment, la technique de l'électrophorèse capillaire (CE) a attiré l'attention. Une caractéristique qui est un avantage immense pour l'analyse flavonoïde est la présence du phényle anneau. Cet excellent chromophore est, bien sûr, actif en UV et fournit la raison pour laquelle les flavonoïdes sont si faciles à détecter. Leurs spectres UV sont particulièrement instructifs, en fournissant des informations structurales considérables qui permettent de distinguer le type de phénol et de l'oxydation motif (Zhang *et al.*, 2018).

Dans ce contexte et dans le but d'élucider la structure chimique de la ou les molécules responsables à l'activité inhibitrice sur l' α - amylase, nous avons tenté de faire un fractionnement et un isolement de l'extrait qui s'est présenté le plus intéressant de point de vue inhibition.

II.5.1. Choix de l'extrait

Afin d'isoler de nouvelles substances de plantes, et de trouver de ce fait de nouvelles voies d'applications tant dans les domaines de la pharmacie et afin de rendre la stratégie d'isolement la plus efficace, il convient de sélectionner avec soin la plante à étudier. Dans cette optique, un certain nombre de résultats ont été pris en compte pour sélectionner l'organe de la plante choisie pour l'isolement ainsi que les protocoles d'extraction effectués sur ce dernier.

Nous avons sélectionné par la suite trois de ces plantes dont les extraits aqueux ont montré une activité importante vis-à-vis de l' α -amylase. Ainsi, les espèces retenues sont : *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens* et *Haplophyllum tuberculatum* ; dont de nouveaux échantillons ont été récoltés en avril 2019 à « Oued Morra » - wilaya de Laghouat - , « Zalfana » - wilaya de Ghardaïa et Bannasser Benchohra - la wilaya de Laghouat - respectivement.

Après l'évaluation de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase des extraits des trois métabolites secondaires, (composés phénoliques, alcaloïdes et huiles essentielles), ainsi que les extraits de cinq solvants à polarité croissante (Hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol et méthanol) pour les trois plantes en question ; la partie racinaire de la plante *Asphodelus microcarpus* a été choisie ; pour laquelle tous les extraits ont présenté un bon effet inhibiteur sur l' α -amylase notamment les extraits obtenus par les solvants acétate d'éthyle et dichlorométhane.

Vu que l'habitude a toujours pris le chemin des solvants polaires pour l'isolement des molécules inhibitrices d'hydrolase, les résultats précédents nous ont éclairé un nouveau chemin « pourquoi ne pas tenter un isolement à partir d'extrait moyennement polaire à savoir le **«dichlorométhane»**.

Ces résultats nous ont encouragé à effectuer un essai de fractionnement et d'isolement pour approfondir nos recherches afin d'isoler et de caractériser les molécules inhibitrices. A cet effet, nous avons procédé à une première démarche de purification des composés bioactifs par des méthodes chromatographiques simples. Car parmi les méthodes chimiques d'analyse de plantes, les analyses chromatographiques jouent un rôle très important, ils ont été introduits dans tous les pharmacopées modernes, en raison des nombreux avantages des méthodes chromatographiques (par exemple, leur spécificité et la possibilité de les utiliser pour l'analyse

quantitative et qualitative), ils comportent également une partie intégrante de l'analyse de la plante (Wagner et Bladt, 1996).

Les méthodes chromatographiques le plus souvent appliquées dans l'analyse phytochimique : chromatographie sur papier à une et à deux dimensions, chromatographie sur couche mince à une et à deux dimensions (CCM; également appelée chromatographie planaire), Chromatographie liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en phase gazeuse (GC). Ces méthodes peuvent également être utilisées pour l'isolement des composants individuels des mélanges de composants sur une échelle préparative et micropréparative (Waksmundzka – Hajnos *et al*, 2008).

II.5.2. Chromatographie sur couche mince

La CCM est l'une des techniques la plus utilisée dans le processus d'isolement de produits naturels, elle est principalement utilisée pour surveiller la composition des fractions et a une évaluation préliminaire de la pureté des produits naturels. Les principaux avantages de la CCM sont la vaste gamme de composés polarisés dans lesquels la CCM peut être employée, le court temps d'analyse, le prix modéré par analyse et les multiples fractions de composés qui peuvent être analysées en parallèle sur une seule plaque de CCM (Wagner et Bladt, 1996).

L'extrait brut a été solubilisé dans un solvant adéquat : le dichlorométhane. Il a ensuite été séparé sur CCM dans les conditions générales. Les plaques ont été révélées à l'aide de l'observation sous rayonnement UV à 254 nm et 366 nm, afin de donner un premier aperçu sur la composition des échantillons analysés. Nous avons débuté le traitement par une série de chromatographies analytiques sur couches minces avec différents systèmes d'éluant pour mettre au point l'éluant ou le système d'élution qui donnerait les meilleurs résultats, nous avons utilisé des plaques de Silicagel prêtes à l'emploi à support en aluminium, celles-ci sont développées dans des cuves en verre conventionnel, dont l'atmosphère aura préalablement été saturée en vapeurs de la phase mobile. Les systèmes de solvants employés sont des mélanges binaires : d'hexane et l'acétate d'éthyle.

Les résultats de nos travaux analytiques nous ont poussé à sélectionner le système binaire hexane, et acétate d'éthyle : 6/4 à cause de la richesse en produits et de la séparation plus au moins claire de ses spots.

II.5. 3. Extraction

Les quantités de principes actifs dans les médicaments naturels sont toujours assez faibles. Le processus d'extraction et d'isolement, long et laborieux, a été le clou de l'application des produits naturels dans le développement des médicaments (Petrillo *et al.*, 2016).

Dans le but d'augmenter le rendement en si peu de temps, nous avons procédé à une extraction solide - liquide directement du matériel végétal par un épuisement continu de la poudre par des solvants à polarités croissantes (Hexane, Dichlorométhane, Acétone et Méthanol), à l'aide d'un dispositif de Soxhlet qui est une méthode d'extraction continue automatique à haute efficacité d'extraction qui nécessite moins de temps et de consommation de solvant que la macération ou la percolation (Zhang *et al.*, 2018).

La matière végétale en poudre peut être extraite dans un soxhlet d'abord avec de l'hexane, par exemple, pour éliminer les lipides et ensuite avec de le diclorométhane.

L'extraction par le dichlorométhane est très intéressante, du fait que cet extrait est susceptible de contenir des quantités négligeables de sucre, ce qui présente une nouvelle démarche dans l'isolement d'inhibiteurs d'hydrolase alors que d'habitude l'isolement est toujours à partir d'extrait polaire, et que la présence de sucres dans un extrait polaire comme dans le cas de l'eau ou d'extraits alcooliques, compliquera la détection du maltose dans les essais, et toute inhibition importante sera due à la présence de ces sucres.

Une masse de 700 g de la poudre végétale a été épuisé en continu au Soxhlet par la succession des deux solvants à polarités croissantes : Hexane et Dichlorométhane.

L'extrait dichloromethane est ensuite placé dans un flacon et évaporé à sec à l'étuve à 30°C. L'extrait organique obtenu présente généralement un aspect poudreux, de couleur marron. Le résidu sec est conservé au réfrigérateur jusqu' à son analyse.

II.5. 4. Fractionnement sur colonne ouverte

La chromatographie sur colonne ouverte, est encore largement utilisée en raison de sa simplicité et sa valeur comme une étape initiale de séparation en raison de sa simplicité, de sa grande capacité et du faible coût des adsorbants tels que le gel de silice et les résines macroporeuses. La séparation est basée sur les différences entre les affinités d'adsorption des

produits naturels pour la surface des adsorbants. La sélection des adsorbants (phase stationnaire) ainsi que de la phase mobile est cruciale pour obtenir une bonne séparation des produits naturels. Le gel de silice est l'adsorbant le plus largement utilisé dans la recherche phytochimique. On a estimé que près de 90 % de la séparation phytochimique (échelle préparative) était à base de gel de silice. Le gel de silice est un adsorbant polaire à des groupes silanol, les molécules sont retenues par le gel de silice par des liaisons hydrogène et des interactions dipôle-dipôle (Zhang *et al*, 2018).

Le fractionnement de l'extrait Dichlorométhane des tubercules d'*A.microcarpus* a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice.

Une masse bien déterminée de l'extrait Dichlorométhane sec est dissoute dans un petit volume de Dichlorométhane. Cette dernière est déposée sur une colonne confectionnée avec 30 g de gel de silice (2,5- 13 cm) préparée dans de l'hexane, l'élution est réalisée avec une phase mobile qui est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour les CCMs analytiques. Toutefois, l'élution peut être accélérée grâce à l'addition progressive de solvants de plus en plus polaires par rapport à la phase initiale.

L'élution est réalisée donc avec un gradient hexane – acétate d'éthyle, en augmentant la polarité par l'addition progressive de l'acétate d'éthyle jusqu'à 100 % d'acétate d'éthyle, et nous avons terminé par le méthanol.

Les différentes fractions de 2 ml, ont été collectées dans des tubes et analysées par chromatographie sur couches minces afin de confirmer la pureté des molécules séparées. Les plaques ont été examinées à la lumière UV (254 et 356 nm) et les fractions présentant des similitudes sont regroupées ensemble, la séparation sur Gel de Silice, nous a permis de collecter 23 fractions.

II.5. 5. Effet des fractions sur l' α - amylase

L'activité enzymatique de l' α - amylase fongique en présence des différentes fractions est dosée de la sorte : Dans des tubes à essai les milieux réactionnels contenaient 200 μ l du tampon phosphate, 100 μ l d'amidon et 100 μ l de chaque fraction diluée à la même concentration dans du tampon phosphate salé (pH 6,9), et au temps zéro 100 μ l d' α - amylase est ajouté pour débiter la réaction. Un témoin a été préparé de la même façon sans inhibiteur.

Les mesures de l'absorbance ont été enregistrées à 530 nm contre un blanc. L'activité inhibitrice de chaque extrait est calculée selon la même formule décrite précédemment.

Après confirmation de l'activité inhibitrice des fractions sur l' α – amylase par le test précédent, nous avons déterminé pour la meilleure fraction inhibitrice de chaque système son IC_{50} . Pour cela, nous avons varié la concentration des fractions inhibitrices en des concentrations différentes et l'activité inhibitrice est mesurée comme décrit précédemment en introduisant 100 μ l des différentes concentrations variables.

La représentation graphique de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en fractions, permet de déterminer les valeurs d' IC_{50} pour chaque fraction.

II.6. Evaluation de l'activité antioxydante

Les antioxydants sont des composés bénéfiques pour la santé qui contrebalancent un excès d'oxydants, comprenant des espèces réactives de l'oxygène et des radicaux libres, qui peuvent apparaître dans l'organisme humain à la suite de conditions de "stress oxydatif", décrites comme un déséquilibre les oxydants sur les antioxydants ; ce déséquilibre peut éventuellement donner lieu à diverses maladies telles que le vieillissement cellulaire, les mutations et le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives et le diabète (Delattre *et al.*, 2005).

Plusieurs méthodes sont utilisées afin de mesurer l'activité antioxydante d'un matériel biologique. Les plus couramment utilisées sont celles faisant intervenir des composés chromogènes des radicaux naturels qui stimulent les espèces réductrices d'oxygène. Ces méthodes sont répandues en raison de leur facilité de rapidité et de sensibilité. La présence d'antioxydants conduit à la disparition de ces chromogènes radicalaires ; les plus largement utilisés étant l'ABTS et la méthode DPPH. Quelques autres dosages couramment utilisés comme test FRAP, le dosage ORAC, test CUPRAC (Shibamoto, 2014).

Vu qu'une thérapie antioxydante peut être une stratégie utile dans le traitement du diabète de type II et que les composés phénoliques ont prouvé leur importante activité antioxydant ; nous avons évalué le pouvoir antioxydant de nos extraits phénoliques. Dans l'espoir de trouver l'existence d'une relation entre l'activité antioxydante et la capacité inhibitrice vis-à-vis de l' α – amylase.

Suite aux résultats d'inhibition sur l' α – amylase, notre étude s'est focalisée sur les extraits organiques à polarité croissante (dichloromethane, acétate d'éthyl, éthanol et méthanol); dans un but de trouver une relation entre activité inhibitrice et activité antioxydante. La mise en évidence du pouvoir antioxydant de ces extraits, a été réalisée par quatre tests chimiques *in vitro* : le test du DPPH, le test de l'ABTS, le test CUPRAC et le test FRAP.

II.7.1. Test DPPH

Dans ce test chimique, on s'intéresse à mesurer l'activité de balayage du radical libre par les fractions antioxydantes de nos extraits phénoliques en employant le radical stable 1,1-diphényl-2- picrylhydrazyl (DPPH $\cdot$)

Cette méthode est basée sur le balayage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH $\cdot$) en en diphénylpicryl hydrazine par des antioxydants, (Figure II.2) qui produit une diminution de l'absorbance à 517 nm. Quand une solution de DPPH $\cdot$ est mélangée avec une substance qui peut donner un atome d'hydrogène, la forme réduite du radical est générée et accompagnée d'une perte de couleur.

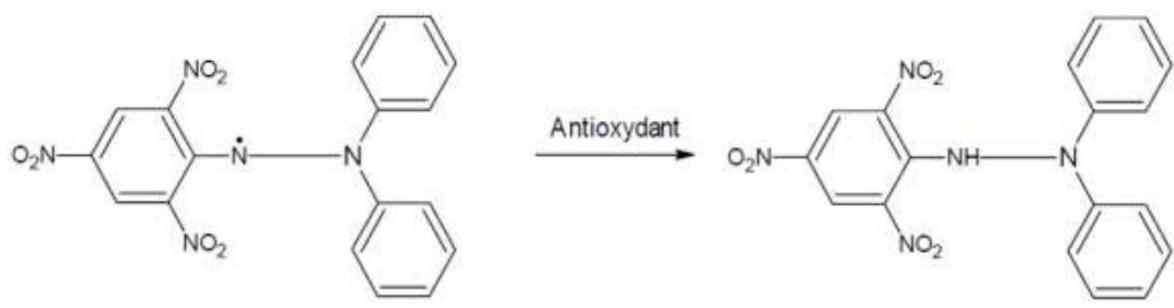
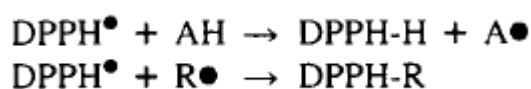


Figure II.3. Schéma réactionnel représente la Réduction du radical libre DPPH $\cdot$

La réaction primaire du radical DPPH et la molécule donateur AH est la suivante :



La réduction du radical libre DPPH $\cdot$ par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des extraits phénoliques.

Le DPPH[•] est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger les radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques.

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH a été déterminée suivant la méthode de (Brand Williams *et al.*, 1995). Pour réaliser le test DPPH[•] dans un tube à essai 500 µl de chaque fraction d'extrait phénolique dilué dans du méthanol de concentration croissante a été additionné à 500 µl d'une solution de DPPH[•] (250 µM) préparée dans le méthanol. Le mélange réactionnel a été secoué immédiatement, puis maintenu à l'obscurité pendant une durée de 30 minutes à une température ambiante.

L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm contre un blanc avec le même spectrophotomètre utilisé pour les procédures expérimentales précédentes. Nous avons également, mesuré le pouvoir antiradicalaire par la même procédure pour l'Acide gallique, la Quercétine. Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide ascorbique en calculant le paramètre VCEAC

II.6.2. Test ABTS^{•+}

Dans ce test chimique, on s'intéresse à mesurer l'activité de balayage du radical libre par les fractions antioxydantes de nos extraits en employant le radical cation 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate ABTS^{•+} qui a été largement appliqué pour estimer l'activité antioxydante..

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration vert bleu en le transformant en ABTS incolore, en présence de l'antioxydant (extraits phénoliques).

Le radical préformé [2, 2'-azino-bis-(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] ou ABTS^{•+} est généré en présence de la peroxydase ; préparée dans une solution tampon pH= 6,8, la réaction est initiée avec l'ajout de la solution de peroxyde d'hydrogène.

En présence d'un antioxydant (extraits phénoliques), le passage du radical ABTS^{•+} à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de la coloration vert- bleu intense qui peut être

suivie. L'ABTS a une couleur bleu-vert relativement stable qui est mesurée à 417 nm (Nia *et al.*, 2014).

L'ABTS est un composé non radicalaire, pour pouvoir mesurer la capacité antioxydante de nos extraits il fallait transformer l'ABTS en un radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (Figure II.3). La génération du radical cationique $\text{ABTS}^{\cdot+}$ a été réalisée par un mélange de trois solutions différentes constituées ; de 1 ml solution aqueuse d'ABTS (20 mM); 150 μl d'une solution aqueuse d' H_2O_2 (30 mM) et une solution de peroxydase de concentration 0.2 mg/ml (préparée dans un tampon phosphate pH = 6,8). Le mélange des trois solutions présente une coloration bleu-vert correspondant à la formation du radical cationique $\text{ABTS}^{\cdot+}$.

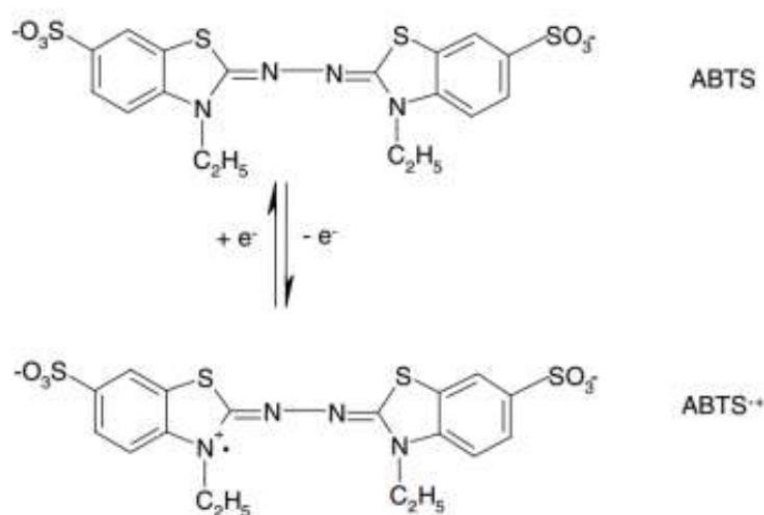


Figure II.4. Structure du 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) : forme réduite ABTS, forme radical cation $\text{ABTS}^{\cdot+}$

Une fois la solution radicalaire d' $\text{ABTS}^{\cdot+}$ prête, le test peut être réalisé, pour ce faire 100 μl de chaque dilution d'extrait à différentes concentrations sont placés dans un tube à essai auquel est ajouté 1 ml de la solution verdâtre d' $\text{ABTS}^{\cdot+}$, le mélange est ensuite agité puis incubé pendant 10 min à l'obscurité et à température ambiante. La mesure de l'absorbance du milieu réactionnel est faite dans le même spectrophotomètre utilisé pour le dosage des composés phénoliques à une longueur d'onde de 417 nm contre un blanc.

Pour ce test également, nous avons mesuré le pouvoir antiradicalaire par la même procédure pour l'Acide gallique, la Quercétine. Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide ascorbique en calculant le paramètre VCEAC

II.6.3. Test CUPRAC

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivi du changement de l'absorbance du complexe néocuproïne (Nc)-ions cuivrique qui subit une réduction en présence d'un agent antioxydant (Ozyurek *et al.*, 2011) (figure II.5). L'absorbance du Cu(I) chélaté formé en conséquence à la réaction redox avec les réducteurs est mesurée à 450 nm.

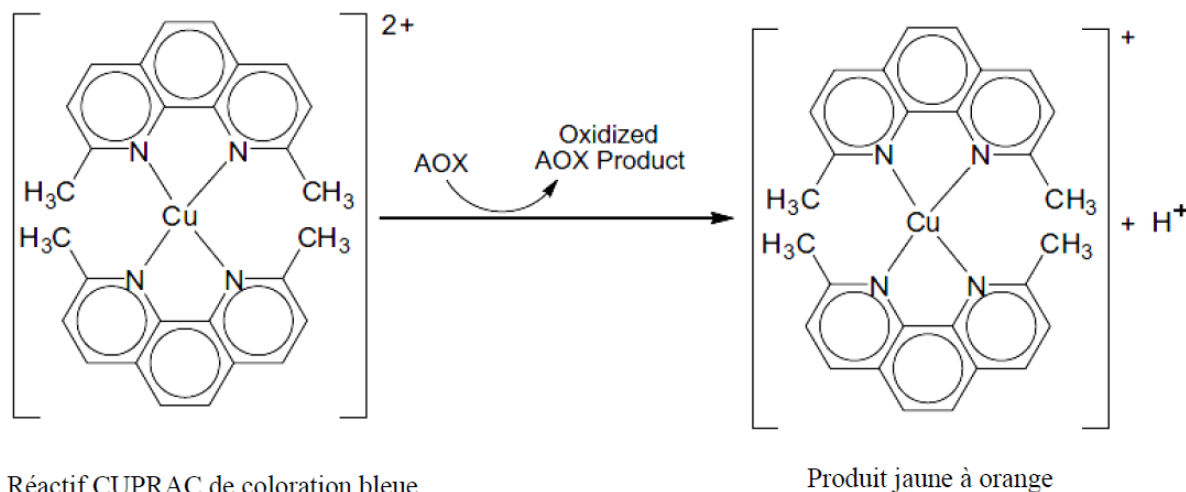


Figure II.5. La réaction CUPRAC et le complexe Cu-néocuproïne

Une quantité de 100 µl de chaque dilution d'extrait dans le méthanol a été mélangée avec 1 ml du tampon d'acétate d'ammonium (1M, pH = 7), 500µl d'une solution de néocuproïne (7,2 mM) et 500µl d'une solution de CuCl₂ (0,01M). Le mélange, qui présente une couleur bleue, est ensuite incubé à l'obscurité pendant 30 min. en présence d'un agent réducteur, la solution change de coloration pour donner une couleur orange. Les absorbances ont été mesurées contre un blanc à une longueur d'onde $\lambda = 450$ nm. Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide ascorbique en calculant le paramètre VCEAC (Hachani *et al.*, 2018). La même procédure expérimentale est réalisée avec la quercétine et l'acide gallique pris comme standards pour des raisons de comparaison.

II.6.4. Test FRAP

Ce test est basé sur la réduction du complexe Fe³⁺-TPTZ (tripyridyltriazine) en sa forme ferreuse (Fe²⁺-TPTZ) par un agent réducteur à un pH acide (figure II.5). Ceci engendre

l'apparition d'une couleur bleue avec une absorbance maximale à $\lambda = 593$ nm (Djeridane *et al.*, 2013).

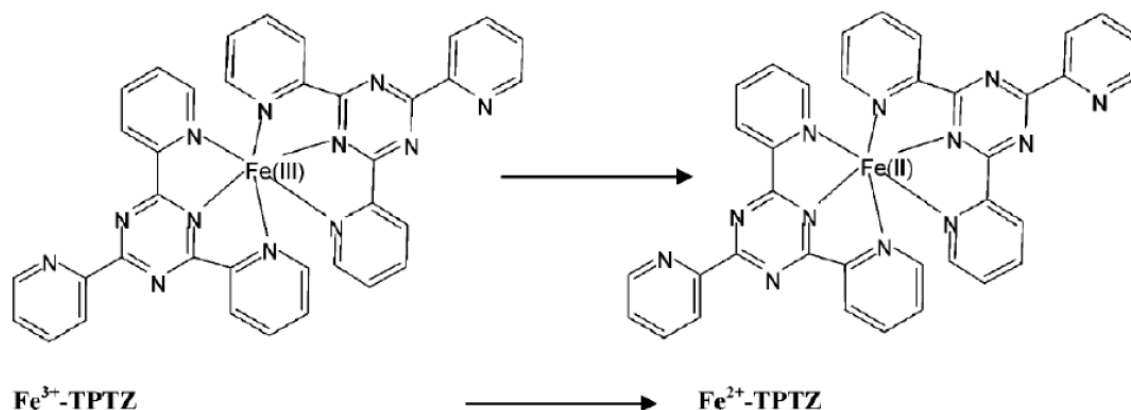


Figure II.6. La réaction FRAP et le complexe Fe^{3+} - TPTZ

Le milieu réactionnel est constitué de 100 μl des extraits dilués dans le méthanol et 1 ml du réactif FRAP. Ce dernier est préparé comme suit : 10 ml d'une solution tampon d'acétate de sodium ($\text{pH} = 3,6$) et mélangé avec 1 ml d'une solution de TPTZ (10 mM préparée dans une solution HCl 40 mM) et 1 ml d'une solution FeCl_3 (20mM). Le mélange réactionnel est ensuite incubé pendant 7min, et les absorbances ont été déterminées contre un blanc à une longueur d'onde $\lambda = 593$ nm. Les résultats sont exprimés en capacité antioxydante équivalente à l'acide ascorbique (VCEAC).

Résultats et discussion

III.1. Préparations des extraits**III.1.1.Extraction aqueuse**

Une fois rendu en poudre, les parties de chaque plantes choisies pour l'étude, ont subi une extraction aqueuse par décoction. Les extraits aqueux obtenus ont subis le même traitement d'évaporation leurs aspects, leurs couleurs et leurs teneurs sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau III.1. Aspect, couleurs et teneurs des extraits aqueux des six plantes investiguées.

Plante		Couleur	Teneurs (%)
<i>Ammodaucus leucotrichus</i>		Jaune clair	29,61
<i>Asphodelus microcarpus</i>	Partie aérienne	Marron foncé	33,70
	Partie racinaire	Marron foncé	10,99
<i>Bubonium graveolens</i>		Jaune	14,98
<i>Cistanche tinctoria</i>		Maron foncé	21,28
<i>Linaria aegyptiaca</i>		Vert clair	19,88
<i>Haplophyllum tuberculatum</i>		Jaune foncé	31,04

D'après les résultats présentés dans le tableau ci-dessus, nous remarquons que tous les extraits ont montré les mêmes aspects visqueux de différentes couleurs : vert, jaune et marron. Les teneurs d'extraction ont varié entre 10,99 % pour l'extrait des racines d'*Asphodelus microcarpus* et 33,70 % pour l'extrait de la partie aérienne pour la même plante. L'extrait de la plante *Haplophyllum tuberculatum* a enregistré également une teneur assez importante égale à 31,04 %.

Nous avons remarqué la pauvreté de nos plantes en métabolites, avec des teneurs ne dépassant pas les 50 % ; ces teneurs des extraits aqueux, peut être attribuée à l'existence de certains enzymes qui dégrade les métabolites extraits à l'eau, de plus, l'exposition à la chaleur, dans ce mode d'extraction peut entraîner une dégradation des composés notamment ceux thermosensibles ce qui a minimisé la teneur (Tiwari *et al*, 2011).

III.1.2. Analyse phytochimique

Après les résultats obtenus suite aux tests d'inhibition établis sur l' α - amylase des six extraits aqueux, le choix s'est finalement fixé sur les trois plantes suivantes : *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens* et *Haplophyllum tuberculatum*; dans le but d'approfondir les connaissances sur la classe métabolique et les molécules responsable de l'activité inhibitrice.

Avant d'entreprendre toute tentative d'extraction et d'étude, nous avons établis des tests phytochimiques sur de nouveaux échantillons des plantes : *Asphodelus microcarpus* (partie aérienne et racinaire), *Bubonium graveolens*, *Haplophyllum tuberculatum* récoltées des régions d'Aflou, de Zalfana et de Benaceur Benchouhra respectivement pour avoir une idée sur l'existence ou non de quelques métabolites secondaires : les flavonoïdes, les saponines et les alcaloïdes et ceci par la mise en place d'un ensemble de réactions de caractérisation de ces différents composés chimiques.

Les résultats des trois tests phytochimiques réalisés sur les différentes poudres de chaque plante étudiée, ont montré qu'elles contiennent des flavonoïdes, et donc, elles peuvent être considérées comme source de composés phénoliques. Les résultats sont consignés dans le tableau III.2

Tableau III.2 : Résultats des tests phytochimiques sur les trois nouveaux échantillons des plantes sélectionnées

Plante		Saponine	Flavonoïdes	Alcaloïde
<i>Asphodelus microcarpus</i>	Partie aérienne	-	++	-
	Partie racinaire	-	++	-
<i>Bubonium graveolens</i>		-	++	-
<i>Haplophyllum tuberculatum</i>		-	++	++

Sachant que : Le symbole « + » est fonction de l'intensité de la coloration et/ou des mousses stables.

(-) absence de métabolite

(+) Présence de métabolite.

(++) Présence importante de métabolite

En vue des résultats des tests phytochimique, nous avons remarqué que toutes les plantes étudiées contiennent des flavonoïdes avec la même présence et donc représente la classe chimique la plus fréquente. Cependant, nous avons constaté l'absence des saponines dans toute les plantes. D'autre part, la présence d'alcaloïdes a été enregistrée uniquement chez la plante *Haplophyllum tuberculatum*.

La production plus importante en flavonoïdes peut être expliquée par l'influence des conditions climatiques et atmosphériques dans lesquelles ont évoluée les plantes, car les composés phénoliques représentent une interface chimique entre les plantes et l'environnement, et leur synthèse est souvent affectée par des facteurs environnementaux (Sampaio *et al.*, 2011).

Egalement un stress hydrique pourrait être à l'origine d'une synthèse importante de flavonoides; le stress hydrique est l'un des plus importants stress abiotiques qui affectent la croissance des plantes et leur développement. Le stress hydrique se produit lorsque l'eau disponible dans le sol est réduite à des niveaux critiques et les conditions atmosphériques s'ajoutent à la perte continue d'eau. Le stress hydrique survient en raison de carence d'eau, généralement accompagné par des températures élevées et des radiations solaires. (Ramakrishna et Ravishankar, 2011).

Par contre l'absence des saponines dans nos plantes, est due peut être au fait que nos échantillon se sont développés dans des zones où les conditions sont favorables ne déclenchant pas une forte synthèse. Comme dans le cas des autres catégories de métabolites secondaires, le niveau de ces composés peut être fortement influencé par beaucoup de facteurs intrinsèques et externes. Les facteurs intrinsèques reflètent l'état physiologique de la plante, qui dépend principalement de stade de croissance et de développement. Les facteurs externes comprennent les effets de l'environnement, à la fois abiotiques et biotiques (la température, la fertilité des sols, la disponibilité de l'eau et de la lumière). De plus les plantes sont confrontées aux conséquences des insectes phytophages ou d'autres animaux herbivores, à la concurrence avec les plantes voisines, et les interactions avec des agents pathogènes et parasites (bactéries, champignons, virus et nématodes) (Szakiel *et al.*, 2011).

III.1.3. Extraction des trois métabolites secondaires (composés phénoliques, alcaloïdes et huiles essentielles)

Les échantillons des trois plantes, ont subi rigoureusement le même traitement de séchage et d'extraction pour chaque type de métabolites. Les aspects, les couleurs et les teneurs des extraits consignés dans le Tableau III.3.

Au regard du tableau précédent, nous remarquons que les extraits phénoliques et alcaloïdes ont montré des aspects visqueux. Un aspect liquide a été constaté pour les extraits d'huiles essentielles. Différentes couleurs ont été enregistrées variant entre Marron, Vert et Jaune pour les différents extraits.

Deux plantes sur trois ont montré l'existence d'huiles essentielles avec des teneurs plus grandes que les extraits phénoliques et alcaloïdes. Les différences de rendement en huiles essentielles d'un organe à un autre ou d'une espèce à une autre ont été rapportées. Selon plusieurs auteurs, la région de récolte de l'espèce, la période de récolte, l'organe de la plante, la durée de séchage et la méthode d'extraction sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent aussi avoir un impact direct sur les rendements en huile essentielle (Daouda, 2014). Une étude histochimique, a été réalisée sur les principaux composés de sécrétion des métabolites secondaires montre qu'il y a une différence dans la répartition et la structure des canaux sécrétoires entre les différents organes des plantes (Andreucci *et al.*, 2008).

Nous avons remarqué que les teneurs en extraits phénoliques sont proches les unes des autres pour les trois plantes, ceci est peut-être due au fait que les trois plantes ont été récoltées à la même période où les contraintes abiotiques sont identiques et aussi les plantes étaient soumises aux mêmes conditions d'extraction (le type du contact matière-solvant, la taille des particules de l'échantillon, l'agitation et la température) (Tiwari *et al.*, 2011).

La plante *Haplophyllum tuberculatum* a présenté l'existence des trois métabolites : composés phénoliques, alcaloïdes et huiles essentielles. En comparant entre les teneurs de ces trois extraits, nous avons constaté que l'extrait alcaloïdique a enregistré la plus faible teneur. L'espèce *Haplophyllum* contient des alcaloïdes, des lignanes, des coumarines, des flavanoïdes et huiles essentielles (Raissi *et al.*, 2016). Mais cette quantité minime peut être liée à une carence en alcaloïdes dans la plante et probablement à des conditions biotiques défavorables dans lesquels la plante a grandi et où la biosynthèse de ces molécules n'était pas stimulée du fait que la biosynthèse des métabolites secondaires est liée à plusieurs facteurs conditions

internes et externes, telles que les facteurs génétiques, les infections, la température et les rayons UV (Biesiada *et al.*,2012)

Tableau III.3. Aspect, couleurs et teneurs des extraits des trois métabolites secondaires des trois plantes étudiées.

Plantes Caractéristiques	<i>Asphodelus microcarpus</i>		<i>Bubonium graveolens</i>	<i>Haplophyllum tuberculatum</i>
	Partie aérienne	Partie racinaire		
Composés phénoliques				
Aspect	Visqueux	Visqueux	Visqueux	Visqueux
Couleur	Maron	Marron foncé	Vert-jaune	Vert –militaire
Teneur %	1,20	1,21	1,90	2,54
Alcaloïdes				
Aspect	-	-	-	Visqueux
Couleur	-	-	-	Vert foncé
Teneur %	-	-	-	0,10
Huiles essentielles				
Aspect	-	-	Liquide	Liquide
Couleur	-	-	Jaune	Vert Clair
Teneur ml/kg	-	-	5,33	3,33

Les extrait aqueux effectué précédemment sur les trois plantes ont montré des teneurs d'extraction nettement supérieure au extraits de métabolites secondaires, ceci est peut être attribuée à la forte capacité de dissolution de l'eau. En fait, l'eau présente un indice de polarité, une constante diélectrique et une énergie de cohésion très élevée par rapport à d'autres solvants, ce qui fournit une liaison forte entre les molécules d'eau et des composés polaires du soluté, provoquant leur dissolution (Markom *et al.*, 2007). Les guérisseurs ou praticiens traditionnels utilisent l'eau principalement comme solvant, mais il existe de nombreux rapports dans lesquels les solvants organiques reste les meilleurs de point de vue activité que les extraits aqueux (Kanerla *et al.*, 2012).

III.1.4. Extraction par solvant organique à polarité croissante

Après évaluation de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase des extraits des trois métabolites secondaires, (composés phénoliques, alcaloïdes et huiles essentielles), nous avons choisi l'extrait phénolique pour continuer et approfondir l'étude. Pour cela, nous avons adopté une extraction des composés phénoliques par une succession de solvants organiques à polarité croissante.

Chaque partie choisie pour l'extraction de chaque plante, a subi la même procédure d'extraction par macération jusqu'à épuisement par une série de solvant à polarité croissante à savoir : l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol et le méthanol successivement. Les extraits organiques obtenus ayant subis le même traitement d'évaporation et les mêmes conditions de conservation ont présenté le même aspect de couleurs différentes variant du vert, jaune à orange. Les aspects, les couleurs et les teneurs de chaque extrait bruts sont consigné dans le Tableau III.4.

D'après les résultats présentés dans le tableau III.4, nous remarquons que les teneurs varient d'un extrait à un autre pour la même plante. Cette différence est aussi distinguée dans un même extrait d'une plante à une autre. Ces différences peuvent être régit par plusieurs facteurs : la partie de la plante utilisée comme matériau de départ, le solvant utilisé pour l'extraction (interaction solide-liquide, diffusion du solvant dans la poudre des plantes dans l'étape de macération et la nature des solvants utilisés pour l'extraction), n'écartons pas aussi le contenant et la nature des composés présents dans les différentes plantes (Tiwari *et al.*, 2011 ; (Prashant *et al.*, 2011). Les matières végétales, contiennent une diversité structurale qui est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols (Mahmoudi *et al.*, 2013 ; Złotek *et al.* 2015).

Les différences peuvent être aussi liées à la saison de récolte où les contraintes abiotique sont différente(la sécheresse, la chaleur, les rayons ultraviolet, la pollution de l'air et les attaques d'agents pathogènes.....) ou à des facteurs liés aux procédures d'extraction employées en tenant compte la durée d'extraction, le type du contact matière-solvant, la taille des particules de l'échantillon, l'agitation et la température (Kanerla *et al.*, 2012).

La plus faible teneur est retrouvé chez l'extrait d'acétate d'éthyle d' *Haplophyllum tuberculatum* (1.50 %), compte à la forte teneur est celle de l'extrait méthanolique de la partie racinaire d'*Asphodelus microcarpus* (7.2 %).

Tableau III.4. Aspect, couleurs et teneurs des extraits organiques à polarité croissante

Plantes Caractéristiques	Asphodelus microcarpus		Bubonium graveolens	Haplophyllum tuberculatum
	Partie aérienne	Partie racinaire		
Hexane				
Aspect	Visqueux	Visqueux	Visqueux	Visqueux
Couleur	Jaune clair	Jaune clair	Jaune clair	Jaune clair
Teneur (%)	2,44	3,08	2,2	1.9
Dichloromethane				
Aspect	Visqueux	Visqueux	Visqueux	Visqueux
Couleur	Jaune	marron Claire	Vert militaire	Jaune claire
Teneur (%)	2,00	1,52	2,9	3,30
Acétate d'éthyle				
Aspect	Visqueux	Visqueux	Visqueux	Visqueux
Couleur	Orange foncé	marron foncé	Vert militaire	Vert
Teneur (%)	1,80	3,8	5,65	1,50
Ethanol				
Aspect	Visqueux	Visqueux	Visqueux	Visqueux
Couleur	Orange foncé	marron foncé	Vert militaire	Vert
Teneur (%)	5,35	5,5	3,89	5,8
Methanol				
Aspect	Visqueux	Visqueux	Visqueux	Visqueux
Couleur	Jaune	marron foncé	Vert militaire	Vert
Teneur (%)	3,6	7,2	3,63	2,62

Les extraits éthanoliques ont présenté les teneurs les plus élevées comparativement aux autres solvants, variant entre 3.89 et 8.5 %, suivi par les extraits méthanol variant 2.62 et 7.2 %, alors que des teneurs plus faibles ont été retrouvées chez les extraits de dichlorométhane variant entre 1,52 et 3.3 %. Ceci est peut-être attribuée au fait que la majorité des solutés sont extractible au éthanol et méthanol, dont la nature et la capacité de dissolution ont permis une forte liaison entre les composés de l'extrait et les molécules du solvant provoquant leur dissolution. Ceci confirme que la nature et le degré de polarité du solvant jouent un rôle important dans l'aspect quantitatif de l'extraction.

D'une autre part, les résultats diffèrent également entre l'extraction hydro – alcoolique et l'extraction directe à partir de la matière végétale. On peut éventuellement dire que le contact liquide - liquide dans le passage d'un rapport de solvants à une série de solvant à polarité différente dans l'extraction hydro – alcoolique a minimisé le passage des composés, par contre le contact solide – liquide dans l'extraction par solvant organique à polarité croissante a permis un meilleur passage direct dans le solvant approprié à la polarité de chaque composé. On prend en considération cette dissimilitude dans la différence entre les deux méthodes d'extraction qui dépendent généralement de la période d'extraction, le solvant utilisé, le pH du solvant, la température, la taille des particules des tissus de la plante, le rapport de solvant à l'échantillon (Tiwari *et al.*, 2011).

L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de la poudre selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction et donc permet de séparer certains flavonoïdes selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et triglycosylés). Cette méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction (Tiwari *et al.*, 2011; Réblová, 2012).

Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes (Lee *et al.*, 2003).

III.2. Quantification des phénols totaux et des flavonoïdes

Avant toute tentative d'étude d'activité biologique, nous avons effectué un dosage des phénols totaux sur les différents extraits préparés. Il n'existe aucune méthode permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés phénoliques présents dans un extrait végétal non purifié, néanmoins, une estimation rapide et globale de la teneur en phénols totaux peut être obtenue par différentes méthodes, en particulier par l'utilisation d'un mélange de phosphomolybdate et phosphotungstate commercialisé sous la dénomination du réactif Folin – Ciocalteu, que nous avons choisi afin de déterminer la teneur en phénols totaux de nos extraits, tandis que, la quantification des teneurs en flavonoïdes dans nos extraits a été réalisée par complexation au trichlorure d'aluminium.

Les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes de chaque extrait, ont été calculée à partir des courbes d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercétine, respectivement et exprimée en milligrammes équivalents en acide gallique par gramme de la matière sèche pour les phénols totaux et en milligrammes équivalents en quercétine par gramme de la matière sèche pour les flavonoïdes. Les résultats obtenus de l'extraction aqueuse sont consignés dans le tableau III.5, ceux de l'extraction hydro - alcoolique dans le tableau III.6, quant à ceux obtenus de l'extraction par succession de solvants à polarité croissante sont résumés dans le tableau III.7.

D'après la synthèse des résultats obtenus pour la quantification des composés phénoliques tableau III.5 (annexe 1), on constate que les teneurs en phénols totaux ont varié entre 0,28 et 19,19 mg EAG/g MS, alors que la quantité des flavonoïdes ont varié entre 0.01 et 1.65 EQe/g MS. Les taux des composés phénoliques les plus élevés ont été détectés chez les extraits des plantes *Cistanche tinctoria* et *Haplophyllum tuberculatum* : 19,19 et 12,33 mg EAG / g de MS respectivement. Tandis que, les plus faibles teneurs sont remarquées chez l'extrait des racines d'*Asphodelus microcarpus*.

Nous avons remarqué les teneurs en phénols totaux des deux parties aérienne et racinaire *Asphodelus microcarpus* on enregistre des valeurs différentes. La partie aérienne a montré une valeur plus élevée en phénols totaux que la partie racinaire (7,35 mg EAG / g MS) et que la teneur chez la partie racinaire est la plus faible même par rapport aux autres plantes. Ceci peut être expliqué par le fait que la partie aérienne est en contact direct avec les conditions climatiques, et ainsi soumise à différents types de stress comme la sécheresse, la chaleur, les

rayons ultraviolets, l'exposition à des températures supérieures ou inférieures, la pollution de l'air et les attaques des agents pathogènes (Biesiada *et al.*, 2012).

Tableau III.5. Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits aqueux des six plantes investiguées.

Plantes		Teneur en Phénols Totaux (mg/g) équivalent en acide gallique	Teneur en flavonoïdes (mg /g) équivalent en quercétine
<i>Ammodaucus leucotrichus</i>		6,37 ± 1,36	0,37 ± 0,00
<i>Asphodelus microcarpus</i>	Partie aérienne	7,35 ± 0,76	0,41 ± 0,20
	Partie racinaire	0,28 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<i>Bubonium graveolens</i>		6,04 ± 0,42	0,10 ± 0,00
<i>Cistanche tinctoria</i>		19,19 ± 1,17	0,44 ± 0,11
<i>Haplophyllum tuberculatum</i>		12,33 ± 2,15	1,65 ± 0,10
<i>Linaria aegyptiaca</i>		3,04 ± 0,11	0,16 ± 0,02

Une étude réalisée au laboratoire des sciences fondamentales, sur 18 autres espèces végétales de la région de Laghouat ayant utilisé la même procédure d'extraction par décoction réalisée dans notre étude ; a montré des teneurs très proches que celles qu'on a enregistré ceci dépend éventuellement de l'espèce étudiée, de la nature des composés et de leur localisation dans la plante (Khacheba *et al.*, 2016).

Au regard des résultats enregistrés de la quantification des phénols totaux pour l'extraction hydroalcolique, nous avons constaté que les valeurs varient entre 0,77 et 6,50 mg EAG/g MS, les valeurs des teneurs en flavonoïdes varient entre 0.34 et 6.15 EQe/g MS.

D'après les résultats du dosage, nous avons remarqué que les teneurs en phénols totaux enregistrés pour l'extraction hydro - alcoolique sont faibles à celle de l'extraction aqueuse. Le test de Folin-Ciocalteu est le procédé le plus utilisé pour la quantification de composés phénoliques totaux dans les matières végétales (Nacz et Shahidi, 2004). Cette méthode est très sensible mais, malheureusement peu spécifique, car beaucoup d'autres composés réducteurs peuvent interférer, avec d'autres composés que les polyphénols tels que les sucres, les protéines et les pigments qu'on estime ont pu passer dans le mélange l'eau utilisé pour l'extraction aqueuse. Ce qui n'a pas été remarqué dans les extraits hydro - alcoolique vu qu'elles étaient très faibles, ainsi on peut dire que la méthodologie suivie dans notre travail a

montré son efficacité pour extraire seulement les composés phénoliques (Pawar et Dasgupta, 2018). La même remarque a été soulevée dans l'étude de (Khacheba *et al*, 2016).

Tableau III.6. Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits hydro-alcoolique

Plante	<i>Asphodelus microcarpus</i>		<i>Bubonium graveolens</i>	<i>Haplophyllum tuberculatum</i>
	Partie aérienne	Partie racinaire		
Teneur en Phénols Totaux (mg/g) EAG	1,5 ± 0,02	0,77 ± 0,03	2,18 ± 0,28	6,50 ± 0,02
Teneur en Flavonoïdes (mg/g) EQ	0,53 ± 0,25	0,34 ± 0,00	0,56 ± 0,02	6,15 ± 0,15

Ceci peut avoir aussi une relation avec les conditions atmosphériques de la saison de récolte des nouveaux échantillons ; dans une saison, une large gamme de contraintes environnementales (hautes et basses températures, la sécheresse, l'alcalinité, la salinité, le stress UV et une infection pathogène) sont potentiellement nuisibles pour les plantes et influent directement sur le contenu en phénols (Ramakrishna et Ravishankar, 2011).

Des études réalisées au laboratoire des sciences fondamentales : (Khacheba *et al*, 2014), sur 5 autres espèces végétales de la région de Laghouat ayant utilisé la même procédure d'extraction par un mélange hydro – alcoolique méthanol/eau : 80/20 réalisée dans notre étude ; où ils ont utilisé le dichlorométhane avant l'acétate d'éthyle et (Khacheba *et al*, 2016) ayant utilisé la même procédure d'extraction que la nôtre, ont révélée des valeurs très proches de celles enregistrées pour notre plante. Ces rapprochements sont dus au mélange de solvants hydro - alcoolique choisis sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs qui ont révélé que les solvants mixtes sont très efficaces à extraire les composés phénoliques et aboutissent à un fort enrichissement des extraits due à l'augmentation de la solubilité comparativement à ceux obtenus par des solvants purs (Handa *et al.*, 2008 ; Jones et Kinghorn, 2005).

Au regard des résultats enregistrés de la quantification des phénols totaux pour l'extraction par solvants à polarité croissante (Tableau III.7), nous avons constaté que les valeurs varient entre 0,08 et 3,5 mg EAG/g de matière sèche dont la meilleure teneur est soulevée chez l'extrait méthanolique de *Bubonium graveolens*.

Les résultats, montrent des valeurs plus importantes dans les solvants polaires à savoir l'éthanol et le Méthanol par rapport aux solvants peu et non polaires Dichlorométhane et Hexane. Ce qui confirme que la solubilité des composés phénoliques est régie par le type de solvant utilisé (polarité) et que le Méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'eau, l'acétate d'éthyle et, dans une moindre mesure, le propanol, le diméthylformamide, et leurs combinaisons sont fréquemment utilisés pour l'extraction des composés phénoliques contrairement aux autres solvants. Aussi, le type de solvant et la polarité peuvent affecter la qualité de l'extrait, la quantité, la vitesse d'extraction, les composés inhibiteurs, la toxicité, les autres activités biologiques et la biosécurité (Abdul Wakeel *et al.*, 2019).

En comparant les résultats obtenus par extraction par solvant à polarité croissante à ceux aqueuse et hydro – alcoolique, on remarque qu'il y a une légère différence de contenus en phénols totaux excepté et parfois même une diminution. Comme l'extraction des composés phénoliques dans les substances végétales est influencée par leur nature chimique, la méthode d'extraction utilisée, la taille des particules de l'échantillon, le temps de stockage, ainsi que la présence de substances interférentes (Naczki et Shahidi, 2004). On peut expliquer cette différence par le type d'extraction suivi, la nature du solvant utilisé, sa concentration et son degré de polarité, la durée d'extraction, la température et le type du contact matière-solvant lors de notre traitement des échantillons. Ces variations dans les différents procédés d'extraction affecteront la quantité de la composition en métabolites secondaires d'un extrait (Tiwari *et al.*, 2011).

Tableau III.7. Teneur en phénol totaux et en flavonoïdes des différents extraits organiques des trois plantes étudiées.

Plantes Teneurs	<i>Asphodelus microcarpus</i>		<i>Bubonium graveolens</i>	<i>Haplophyllum tuberculatum</i>
	Partie aérienne	Partie racinaire		
Hexane				
Teneur en Phénols Totaux (mg/g) EAG	0,20 ± 0,01	0,08 ± 0.00	0,53 ± 0,11	0.3 ± 0,02
Teneur en Flavonoïdes (mg/g) EQ	0,004 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Dichloromethane				
Teneur en Phénols Totaux (mg/g) EAG	0,52 ± 0,03	0.21±0.01	0,61 ± 0,03	0,30 ± 0,00
Teneur en Flavonoïdes (mg/g) EQ	0,1 ± 0,04	0,15 ± 0,00	0,46 ± 0,12	0,05 ± 0,01
Acétate d'éthyle				
Teneur en Phénols Totaux (mg/g) EAG	0,39 ± 0,06	0,16 ± 0,00	0,66 ± 0,02	0,27 ± 0,01
Teneur en Flavonoïdes (mg/g) EQ	0.25 ± 0,07	0,06 ± 0,00	0,21 ± 0,07	0,07 ± 0,01
Ethanol				
Teneur en Phénols Totaux (mg/g) EAG	1,3 ± 0,08	0,50±0.01	1, 19 ± 0,19	1,31 ± 0.40
Teneur en Flavonoïdes (mg/g) EQ	0,75 ± 0,10	0,08±0.00	0,42 ± 0,09	0,15 ± 0.05
Méthanol				
Teneur en Phénols Totaux (mg/g) EAG	1,40 ± 0,2	1,95 ± 0,02	3,53 ± 0,21	0,93 ± 0,07
Teneur en Flavonoïdes (mg/g) EQ	0,8 ± 0,08	0,18±0,00	1,11 ± 0,15	0,51 ± 0.34

Or les valeurs obtenues n'ont pas été pour autant très satisfaisantes car elles restent très globales et ne donnent aucune indication sur les différents composés présents dans nos échantillons, sachant que chacun d'entre eux peut réagir de manière différente dans la réaction colorée. Le réactif de Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique pour détecter tous les groupes phénoliques présents dans les extraits. Selon Singleton et Ross (1965) divers composés phénoliques ont des réponses différentes à ce test. La réponse à cette méthode est à peu près proportionnelle au nombre de groupes hydroxyles phénoliques dans un substrat donné, mais la capacité de réduction est renforcée lorsque les deux groupes hydroxyles phénoliques sont orientés en ortho ou para (Naczki et Shahidi, 2004). D'autre technique pour la quantification de ces composés telle que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) peut être utilisée. Ces analyses permettront la séparation et la quantification de composés phénoliques ainsi que la connaissance des principales classes de composés phénoliques présentes dans chaque extrait ainsi que leurs quantités relatives.

En comparant les résultats obtenus par les trois méthodes d'extraction, on remarque qu'il y a une légère différence de contenus en phénols totaux excepté les extraits aqueux et méthanolique ont présenté un contenu phénolique plus élevé. La première étape d'analyse d'une plante, reste cruciale. L'application de méthodes d'extraction conventionnelle est liée aux petits rendements d'extraction, au long temps d'extraction, à la forte utilisation de solvants et à la toxicité significative. C'est pourquoi, dans le cadre de cette étude nous avons été confrontés à des résultats plus au moins différents. Aussi les plantes choisies pour l'étude sont développées dans des sites géographiques différents avec des conditions de croissance complètement distinctes; Le climat local, les variations saisonnières, les conditions extérieures telles que la lumière, la température, l'humidité affectent la composition des métabolites secondaires (Ramakrishna et Ravishankar, 2011).

Les différences observées au niveau des teneurs entre les différents échantillons d'une même espèce ainsi qu'entre les différents extraits d'un même échantillon peuvent être expliquées par la différence dans la composition en composés phénoliques de chaque échantillon, ainsi qu'à la nature des solvants utilisés lors de l'extraction et la méthode d'extraction, la saison de récolte, et les conditions climatiques de la région dans laquelle la plante a été récoltée (Ramdane *et al.*, 2017 et Ziani *et al.*, 2015).

Dans des études réalisées par Mayoufa *et al.*, 2019 ; Kitaz, 2017 et Petrillo *et al.*, 2016 sur l'espèce *Asphodelus microcarpus* ayant utilisé le méthanol absolue comme méthode

d'extraction ont montrées des teneurs en phénols totaux supérieurs. Des extraits éthanoliques pour la même espèce dans l'étude de Kitaz *et al.*, 2017 ont montré des teneurs en phénols largement plus importantes que celle observée chez notre plante ceci peut être dû aux type de solvant d'extraction ainsi que les procédures d'isolation peuvent avoir un impact significatif sur le rendement des extraction de polyphénols à partir de matériel végétal, l'éthanol et le méthanol sont des alcool présentent une quantité plus élevées à extraire les polyphénols par rapport aux autre solvant tel que l'eau. (Tiwari *et al.*, 2011).

La quantification des flavonoïdes dans nos extraits a été déterminée spectrophotométriquement par la méthode du chlorure d'aluminium et les résultats obtenus exprimés en milligrammes équivalent rutine par gramme de la matière sèche sont regroupés dans les tableaux précédents

Nous avons remarqué que le contenu en flavonoïdes varient de la même manière que les phénols pour les trois type d'extraction ; les teneurs sont plus élevées chez les solvants polaires à savoir l'Acétate d'éthyle et le méthanol que les autres chez les extraits obtenus par extraction par solvant à polarité croissante ce qui est toujours influencé par la nature polaire des composés phénoliques. Les teneurs sont également faibles chez les extraits obtenus par extraction hydro - alcoolique conséquence des conditions atmosphériques de la saison de récolte des nouveaux échantillons.

Il est clair que les taux en flavonoïdes sont inférieurs mais très proches de ceux des phénols ; ce qui indique que presque tous les phénols extraits sont des flavonoïdes. Le reste pourrait être d'autres composés phénoliques possédant d'autres structures chimiques que celles des flavonoïdes (Acide phénoliques, tanins, stilbènes. . .) présentes en quantités minimales.

À travers les résultats cités dans les tableaux, et comparativement aux teneurs en phénols, quelques plantes ont montré leur richesse en flavonoïdes notamment *Bubonium graveolens*.

En conclusion, les solvants peuvent dissoudre les substances phytochimiques qui ont un indice de polarité similaire ou proche au sien. Ainsi, pour les fractions d'extraits bruts hautement actifs, un solvant spécifique doit être utilisé pour l'isolation et le fractionnement. Selon l'étude de Abdul Wakeel *et al.*, 2019, la corrélation positive entre les branches, les fleurs, les feuilles et les racines avec diverses quantités d'extraits bruts indique que les différentes parties de la plante ont une quantité différente de composés phytochimiques solubles qui nécessitent un solvant très spécifique pour l'isolation. Les différents composés

biologiques ont une polarité différente et peuvent être extraits avec un solvant ayant un indice de polarité approprié (Abdul Wakeel *et al.*, 2019). Ainsi un bon solvant est caractérisé par son extraction optimale et sa capacité à conserver la stabilité de la structure chimique des composés recherchés. Par conséquent, le type de solvant d'extraction et sa polarité peuvent avoir un impact important sur la teneur en polyphénols extraits (Thouri *et al.*, 2017).

Aussi les plantes médicinales possèdent une large gamme de substances phytochimiques qui dépendent directement du stade de développement de la plante, des parties de la plante et des solvants utilisés pour l'extraction et l'isolement de ces substances phytochimiques.

III.3. Effet d'inhibition vis-à-vis l' α – amylase

Diverses approches pharmacologiques sont utilisées pour améliorer le traitement du diabète par différents modes d'action telles que la stimulation de la sécrétion d'insuline, l'augmentation du nombre de transporteurs de glucose, l'inhibition de la néoglucogenèse et la réduction de l'absorption du glucose à partir de l'intestin. La meilleure approche thérapeutique pour le traitement du diabète et de diminuer l'hyperglycémie surtout après un repas est de retarder et réduire la digestion des glucides ingérés par l'intermédiaire de l'inhibition de la principale enzyme hydrolysant les glucides alimentaires l' α - amylase dans les organes digestifs (Nickavar *et al.* , 2008 ; Heo *et al.*, 2009)

D'une manière générale, un inhibiteur est tout composé dont la fixation sur la molécule enzymatique entraîne son inactivation partielle (ou totale), ce qui se traduit par une baisse (ou une annulation) de la vitesse initiale (Cornish-Bowden *et al.*, 2004)

En thérapeutique, le traitement pour les diabétiques de type II et pour contrôler la glycémie l'acarbose, le voglibose et le miglitol sont largement utilisés comme inhibiteurs compétitifs de l' α - amylase, seuls ou en combinaison avec d'autres agents anti-diabétiques. Toutefois, l'utilisation continue de ces agents de synthèse devrait être réduite, car ces inhibiteurs sont connus pour provoquer de nombreux effets secondaires, tels que des flatulences, ballonnement, crampes abdominales, vomissements, distension abdominale et diarrhée). En outre, certains d'entre eux peuvent augmenter l'incidence des tumeurs du rein, des troubles du foie (l'atteinte hépatique et d'hépatite aigüe). Par conséquent, de nombreux efforts ont été faits pour identifier de nouvelles sources antidiabétiques provenant de différentes plantes médicinales traditionnelles sans aucun effet secondaire est encore un défi pour le système médical et le but idéal des chercheurs (Khacheba *et al.*, 2016).

III.3.1. Effets d'inhibition des extraits aqueux

Afin de repérer les plantes ayant une capacité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase, des tests d'inhibitions *in vitro* ont été effectués pour chaque extrait. Dans notre étude, l'activité enzymatique de l' α -amylase a été mesurée sur son substrat, l'amidon. Ces tests d'inhibitions effectués à la même concentration d'extraits nous ont permis de calculer les taux d'inhibition. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau III. 8. Pourcentage d'inhibition des extraits aqueux des six plantes investiguées.

Plante		Pourcentage d'inhibition (%)
<i>Ammodaucus leucotrichus</i>		N.D
<i>Asphodelus microcarpus</i>	Partie aérienne	40,40±0,56
	Partie racinaire	100±0,00
<i>Bubonium graveolens</i>		18,61±0,26
<i>Cistanche tinctoria</i>		12,14±0,25
<i>Haplophyllum tuberculatum</i>		18,06±0,00
<i>Linaria aegyptiaca</i>		13,58±0,60

Après analyses des résultats obtenus, nous avons constaté que tous les extraits préparés ont présenté un potentiel d'inhibition vis-à-vis de l' α - amylase à différents taux d'inhibition à l'exception de la plante *Ammodaucus leucotrichus* qui n'a présenté aucune inhibition.

Les valeurs calculées sont comprises entre 12,14 et 100 %. Nous avons constaté que l'extrait des racine d'*Asphodelus microcarpus* a est présenté un puissant pouvoir d'inhibition vis-à-vis de l' α - amylase avec de pourcentage maximal 100 %, alors que le pourcentage d'inhibition de la partie aérienne de la même plante n'a pas dépassé les 50 %. Les extraits des deux plantes *Bubonium graveolens* et *Haplophyllum tuberculatum* ont enregistré des pourcentages d'inhibitions très proches compris de 18,61 et 18,06% respectivement. Une étude réalisée au laboratoire des sciences fondamentales sur 18 plantes antidiabétiques locales, a montré des pourcentages d'inhibition dont la majorité sont inférieur à 20 % (Khacheba *et al.*, 2016). Il est clair que les pourcentages d'inhibition diffèrent entre les extraits. Cette constatation peut être expliquée par le fait que la composition en composés actifs et leurs structures chimiques dans nos extraits de plantes varient avec l'espèce, ce qui mène à différentes contacts avec le site

actif de l'enzyme, ce qui prouve que la composition et la structure jouent un rôle important dans l'inhibition (Khacheba *et al.*, 2014).

III.3.2. Effets d'inhibition des extraits des trois métabolites secondaires (composés phénoliques, alcaloïdes et huiles essentielles)

Après analyse des résultats des différentes valeurs de pourcentage d'inhibition enregistrées pour les six plantes choisies pour débiter l'étude (Tableau III.8), nous avons constaté que sur les six plantes ; trois d'entre elles ont consigné des valeurs intéressantes vis - à - vis de l'enzyme, notamment *Asphodelus microcarpus* dont les valeurs sont supérieures à 40 %; ce qui nous a poussé à choisir ces dernières pour plus d'étude approfondie dans le but d'éventuelle tentative d'isolement et de caractérisation des molécules responsables de l'inhibition .

Dans ce contexte de nouveaux échantillons des trois plantes : *Asphodelus microcarpus* (partie aérienne et racinaire), *Bubonium graveolens*, *Haplophyllum tuberculatum* ont été récolté des régions d'Aflou, de Zalfana et de Benaceur benchouhra respectivement, sur lequel nous avons entrepris trois extraction organique des métabolites secondaires classique : composés phénoliques, alcaloïdes et composés terpéniques (huiles essentielles) ; question de sélectionner la classe métabolique responsable de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase.

Sur ces extrait, nous avons procédé à l'étude de l'activité anti – amylasique, afin de déterminer pour chaque extrait et dans les mêmes conditions réactionnelles le paramètre IC₅₀ qui représente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse réactionnelle jusqu'à 50% de sa valeur maximale non – inhibée et ceci par deux réactifs DNS et néocuproïne pour des raisons de comparaisant.

Pour cela, nous avons varié la concentration en inhibiteurs et nous avons introduit 100 μ l des différentes concentrations.

Les représentations graphiques de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en extraits (voir annexe 2), nous ont permis de déterminer les valeurs d'IC₅₀ pour chaque extrait que nous avons regroupés dans le tableau III.9.

Tableau III.9. Valeurs des IC₅₀ (mg/ml) des extraits des métabolites secondaires vis - à vis de l'α - amylase.

Plante Paramètre	<i>Asphodelus microcarpus</i>		<i>Bubonium graveolens</i>	<i>Haplophyllum tuberculatum</i>
	Partie aérienne	Partie racinaire		
Composés phénolique				
IC ₅₀ / DNS (mg/ml)	5,94 ± 0,11	5,39 ± 0,16	4,35 ± 0,17	6,77 ± 0,22
IC ₅₀ / Néocuproïne (mg/ml)	2,7 ± 0,00	0,39 ± 0,00	2.61 ± 0,06	0.76 ± 0,01
Alcaloïdes				
IC ₅₀ / DNS (mg/ml)	-	-	-	0.37 ± 0,10
IC ₅₀ / Néocuproïne (mg/ml)	-	-	-	0,03 ± 0,00
Huiles essentielles				
IC ₅₀ / DNS (mg/ml)	-	-	9,77 ± 0,05	34,96 ± 2,56
IC ₅₀ / Néocuproïne (mg/ml)	-	-	-	-

Au regard du tableau précédent, nous avons noté que les valeurs d'IC₅₀, ont variée entre 0.37 et 34,96 mg/ml pour la méthode au DNS, tandis que les valeurs d'IC₅₀ ont variée entre 0,03 et 2.7 mg/ml par la méthode à la néocuproïne.

Nous avons remarqué, que les résultats obtenus pour les extraits phénoliques et pour les deux réactifs ne sont pas espacés d'une plante à une autre, ils varient presque dans le même intervalle, exceptée l'extrait des racines d'*Asphodelus microcarpus* qui a enregistré la plus faible valeur forte valeur 0,39 mg/ml ; faisant de celle-ci la meilleure fraction phénolique inhibitrice. Ce rapprochement de valeurs dans les deux types d'extraction, est du peut être à l'existence de molécules actives de structure plus au moins rapproché ou ayant le même mécanisme d'action inhibitrice ainsi que l'existence de molécules de polarités identiques laissant ces dernières extractibles dans un même solvant et de structure proche les une des autres leur donnant un même effet biologique (Złotek *et al.*, 2015).

L'extrait d'alcaloïde de la plante *Haplophyllum tuberculatum* a enregistré les meilleurs IC₅₀ comparativement aux autres extraits 0.37 et 0,03 mg/ml avec les deux méthodes DNS et

néocuproïne respectivement, ceci peut être attribuée à la présence de fonction amine des alcaloïdes. De nombreux inhibiteurs d'enzymes (hydrolase de sucre) existent et jouent un rôle important à la fois dans l'approfondissement des connaissances sur les mécanismes d'hydrolyse enzymatique des glucides, mais aussi comme outil thérapeutique. Parmi ces inhibiteurs, les iminosucres et les carbasucres, analogues de sucres dont l'atome d'oxygène a été remplacé respectivement par un atome d'azote et un atome de carbone, sont des composés particulièrement actifs. Certains sont même actuellement commercialisés en tant qu'antidiabétiques tels que la valiènamine, la valiolamine et la validamine et font partie de la famille des aminocyclitols. Des alcaloïdes pipérinidiques ont aussi montré des propriétés inhibitrices vis-à-vis de glycogène phosphorylase. Par exemple, l'isofagomine 9 est un excellent inhibiteur avec un $IC_{50} = 0,7 \mu M$. Par contre la fagomine 10 c'est un inhibiteur modéré de cette enzyme ($IC_{50} = 200 \mu M$). Pour cette famille d'inhibiteur, cela illustre l'importance de la position pseudo-anomérique pour l'atome d'azote. Dans l'état de transition, la charge positive doit se localiser plutôt sur le carbone anomérique. (El Blidi, 2006)

D'un autre côté les extraits de huiles essentielles ont montré une faible activité inhibitrice ce qui peut être attribuée à l'existence de molécules terpéniques à caractère apolaire les rendant moins actifs vis-à-vis de l'enzyme. Ce qui confirme que le contact molécule active et site actif jouent un rôle important dans le phénomène d'inhibition (Scheen *et al.*, 2002).

L'activité inhibitrice enzymatique de plusieurs plantes est due aux composés polyphénoliques (Tundis *et al.*, 2010). Plusieurs de ces polyphénols ont une action sur l' α -amylase tels que les tannins qui sont capables de se lier aux enzymes digestives et de les inhiber (Kandra, 2004). De ce fait, nous avons comparé les résultats de l'activité inhibitrice des extraits phénoliques et leur teneurs où nous avons remarqué que les teneurs en phénols totaux et les valeurs en IC_{50} varient de manière inversement proportionnelle, car pour des extraits riches en phénols totaux on remarque une faible inhibition vis-à-vis de l'enzyme. Nous prenons par exemple, l'extrait de la plante *Haplophyllum tuberculatum* dont les quantités sont élevées en polyphénols et en flavonoïdes 6,50 et 6,15 mg/g respectivement inhibent faiblement l' α -amylase. Cela veut dire, que plus la quantité en phénols totaux et flavonoïdes augmente moins l'extrait est efficace et les valeurs en IC_{50} augmentent. Dans ce cas on peut dire qu'il y a une relation structure / fonction des principes actifs et l'inhibition pour ces extraits vis-à-vis de l'enzyme dépend de la structure de la molécule inhibitrice et non de la quantité.

Les valeurs d'IC₅₀ obtenues avec le réactif néocuproïne sont toutes meilleures que celles obtenues par le réactif DNS de l'extraction mais avec une légère différence, due peut être à l'effet chélateur de la néocuproïne sur le co-enzyme de l' α - amylase le Ca²⁺ empêchant ainsi l'activité enzymatique et / ou diminution de cette dernière.

III.3.3. Effets d'inhibition des extraits organiques à polarité croissante

Après analyse des résultats des IC₅₀ des extraits des trois métabolites secondaires classique, nous avons remarqué que les extraits phénoliques se sont montré les plus intéressants en terme d'inhibition vis-à-vis de l' α – amylase. Ainsi, nous avons adopté un nouveau protocole d'extraction question d'améliorer le rendement et de faire une première démarche de fractionnement des molécules en fonction de leurs polarités, en choisissant une extraction directement du matériel végétal par succession de solvants à polarités croissantes (Hexane, Dichlorométhane, Acétate d'éthyle, éthanol et Méthanol)

Dans cette partie du travail, l'activité inhibitrice a été évaluée sur deux α - amylase (humaine « salivaire » et fongique « *Aspergillus oryzae* ») et en utilisant deux réactifs CNPM3 et le DNS.

Dans le but de repérer les capacités inhibitrices de ces nouveaux extraits et d'étudier leurs comportements sur l'activité enzymatique des deux enzymes (augmentation ou diminution) c'est-à-dire quel pourcentage d'inhibition ils pouvaient atteindre, nous avons procédé à une étude de leur effet par des tests d'inhibition effectués à la même concentration et calculer leur taux d'inhibition. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau III.10. Taux d'inhibition des extraits organiques des plantes étudiées vis - à vis de l' α – amylase salivaire et d'*Aspergillus oryzae*

Taux d'inhibition (%)				
Plante Enzyme / réactif	<i>Asphodelus microcarpus</i>		<i>Bubonium graveolens</i>	<i>Haplophyllum tuberculatum</i>
	Partie aérienne	Partie racinaire		
Hexane				
Humaine / CNPM3	19,39 ± 0,03	ND	17,97 ± 0,01	22,55 ± 0,03
Fongique / CNPM3	14,25 ± 0,02	22,56 ± 0.00	20,10 ± 0,01	22,98 ± 0,01
Fongique / DNS	ND	35,70 ± 0.01	1,40 ± 0,04	ND
Dichloromethane				
Humaine / CNPM3	14.13 ± 0,01	49,83 ± 0,05	21,45 ± 0,03	25,70 ± 0,03
Fongique / CNPM3	10,49 ± 0,02	35,2 ± 0,03	4,01 ± 0,01	1,63 ± 0,02
Fongique / DNS	5,09 ± 0,05	100 ± 0,17	100 ± 0,2	75,26 ± 0,04
Acétate d'éthyle				
Humaine / CNPM3	25,12 ± 0,00	35,22 ± 0,03	21,60 ± 0,02	28,40 ± 0,00
Fongique / CNPM3	20,10 ± 0,02	25,02 ± 0,02	33,97 ± 0,00	34,09 ± 0,00
Fongique / DNS	42,01 ± 0,05	100 ±0,02	100 ± 0,01	100 ± 0,01
Ethanol				
Humaine / CNPM3	24,17 ± 0,01	14,21±0,04	34,10 ± 0,01	18.37 ± 0,02
Fongique / CNPM3	11,35 ± 0,00	13,57±0,00	22,19 ± 0,00	29,90 ± 0,01
Fongique / DNS	11,65 ± 2,02	5,13 ± 0,85	4,2 ± 0,04	15,9 ± 0,01
Methanol				
Humaine / CNPM3	56,15 ± 0,00	12,12 ± 0,00	34,39 ± 0,00	63,27 ± 0,00
Fongique / CNPM3	48,75 ± 0,01	0,00 ± 0,00	23,49 ± 0,03	63,93 ± 0,01
Fongique / DNS	50,6 ± 0,15	2,69 ± 1,05	59,00 ± 0,01	100 ± 0,05

Après analyses des résultats obtenus, nous avons constaté que tous les extraits préparés présentent un potentiel d'inhibition vis-à-vis de l' α – amylase à différents taux d'inhibition à l'exception des extraits méthanolique et hexanique des racines d'*Asphodelus microcarpus* de

la partie racinaire qui ont enregistré aucune inhibition vis-à-vis des deux enzymes en utilisant le réactif CNPM3. Le phénomène d'inhibition est le résultat d'une synergie entre plusieurs molécules on peut expliquer ces taux par la séparation de certaines molécules dans plusieurs solvants d'extraction qui auraient pu donner des taux plus importants s'ils étaient présents ensemble dans le même milieu réactionnel (Ranga *et al.*, 2009).

La majorité des taux d'inhibition n'ont pas dépassé les 50 %, cependant des extraits se sont montré très puissant avec un taux maximal de 100 % à savoir : les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de *Bubonium graveolens* et des racines d'*Asphodelus microcarpus* ainsi que les extraits acétate d'éthyle et méthanol d'*Haplophyllum tuberculatum*.

Globalement la plante *Haplophyllum tuberculatum* a dévoilé des pourcentages meilleurs que le reste des plantes, particulièrement les extraits acétate d'éthyle et méthanol avec taux d'inhibition très importants variant entre 30 - 60 et 100 %.

Ce qui est nouveau dans cette étude, c'est l'effet inhibiteur de la fraction hexanique non polaire qui a priori ne devrait donner aucun résultat ; ceci peut être expliqué par l'existence de molécules apolaires ou moyennement polaires à activité inhibitrice comme les glycolipides par exemple et avec moins de molécules sucrés qui provoquerait un chevauchement de détection (Loh et Hadira, 2011).

En comparant les taux d'inhibition entre les différents solvants, nous avons constaté que les extraits hexadique et éthanol sont moins actifs par rapport au extrait dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol. Cette différence enregistrée peut être due à la différence de structures des composés extraits qui n'auront pas le même mécanisme d'action ou à l'excitance dans les extraits à faible pourcentage des molécules gênantes (encombrement stérique) qui sont responsables de ces faibles pourcentages (Cornish-Bowden *et al.*, 2004). Les fractions acétate d'éthyle ont montré des taux d'inhibition importants vis-à-vis des deux enzymes par rapport aux fractions dichlorométhane. Les deux solvants diffèrent du point de vue polarité et comme notre enzyme est une hydrolase spécifique aux liaisons osidiques on peut expliquer l'importance des taux chez les fractions acétate d'éthyle et méthanol par le fait que ces solvants de polarité supérieure au dichlorométhane ont permis l'extraction d'un nombre plus important de composés phénoliques de type glycosylés ou une autre explication est envisagée, c'est que les principes actifs responsables de l'inhibition de nos enzymes ne sont pas très extractibles par l'hexadique et l'éthanol (Khacheba *et al.*, 2014).

Nous avons également remarqué, une petite différence de valeurs pour un même solvant d'extraction d'une plante à une autre un pourcentage élevé pour une plante contre un faible pourcentage pour l'autre plante ; ceci du fait que l'effet des composés phytochimiques des plantes extraites par les différents solvants dépend de : de la quantité et la diversité des molécules bioactives existant dans chaque plante parce que les composés phénoliques constituent l'un des groupes les plus importants de métabolites secondaires ou le nombre de cycles phénoliques et des éléments structurels qui lient ces cycles : les flavonoïdes (par exemple, anthocyanines, flavones, isoflavones), les acides phénoliques, les tanins, les stilbènes et les lignines et la synthèse de ces composés dans les plantes varie en fonction de facteurs environnementaux tels que la température et la lumière . Ainsi, il est préférable de récolter les plantes à un moment précis de la journée en fonction de nos besoins. (Wei *et al.*, 2019)

De meilleurs pourcentages d'inhibition ont été enregistrés contre l' α - amylase fongique que celle salivaire en utilisant le même réactif, ce qui prouve que le contact molécule active et site actif joue un rôle important dans le phénomène d'inhibition On sait aujourd'hui qu'il existe près de 25 formes tridimensionnelles différentes des α -amylases avec des propriétés qui peuvent varier en fonction des conformations. Après la résolution de plusieurs structures tridimensionnelles des α -amylases, il apparaît que ces enzymes ont une structure de base commune (domaines A, B, C), ces structures ont rapporté des perspectives sur l'attachement du substrat et sur le processus catalytique de l' α -amylases. Les spécificités diverses en substrats et en produits, des enzymes de cette famille pourraient s'expliquer par l'attachement de différents domaines au noyau catalytique en fonction de l'enzyme. C'est ce qui prouve l'existence d'une similitude globale entre les structures de l' α -amylase mais de petites différences structurales mènent aux différents profils d'hydrolyse et d'inhibition (Laoufi, 2012)

Si on compare les pourcentages d'inhibition vis-à-vis de l'enzyme fongique en utilisant les deux réactif, on remarque que les valeurs obtenues par le réactif DNS étaient considérablement plus élevées que celles obtenues par le réactif CNPM3, notamment les extraits : dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol ; ceci peut être expliqué par le fait que le CNPM3 est un réactif mieux adapté pour évaluer l'activité inhibitrice et que le test DNS ne donne pas des valeurs réductrices proportionnelles au nombre réel de groupes réducteurs hémiacétaliques (Nia *et al.*, 2020).

Comparativement aux pourcentages d'inhibition des extraits aqueux des trois plantes, les extraits polaires acétate d'éthyle et méthanol sont montrés plus efficaces ; ceci peut être attribué au fait que ces solvants sont de bons extracteurs de polyphénols dont la structure inhibe le plus. L'explication la plus utile pour la diminution de l'activité de l'extrait aqueux peut être attribuée à la polyphénol oxydase, enzyme qui dégrade les polyphénols extraits à l'eau, alors que dans le méthanol elles sont inactives. De plus, l'eau est un meilleur support pour l'apparition de micro-organismes (Tiwari *et al.*, 2011).

Aucune étude a été réalisée sur l'inhibition de α -amylase par les extraits de l'espèce *Asphodelus microcarpus*. Alors que l'étude de Lazarova *et al.*, 2020 a noté que les extraits des racines de deux différentes espèces de la famille *Asphodelus* (*Asphodelus albus* and *Asphodelus aestivus*) ont démontré une faible activité inhibitrice contre l' α – amylase. Des résultats identiques ont été enregistrés par Melucci *et al.*, 2018 sur les extraits d'*Asphodeline lutea* Italienne.

Une étude de Chaoua *et al.*, 2019 réalisée au laboratoire des sciences fondamentales sur la même espèce *Haplophyllum tuberculatum* de la région de Laghouat, et ayant utilisé des extraits aqueux a montré une bonne activité inhibitrice contre l' α - amylase. Une synthèse bibliographique réalisée par Abogmaza *et al.*, 2020 a exposé différentes activités biologiques de cette plante mais aucune étude sur l'activité hypoglycémisante n'a été soulevée.

La fraction dichlorométhane des racines d'*Asphodelus microcarpus* des pourcentages d'inhibition très proche de ceux de la fraction acétate d'éthyle chez les deux enzymes, cette fraction qui a fait toujours l'objet de captivations dans plusieurs études suite aux fortes inhibitions qu'elle fournit communément. Ce rapprochement de pourcentage nous a incité à s'intéresser plus à la fraction dichlorométhane dans l'espoir de trouver des molécules ayant le même effet que celles présentes dans la fraction acétate d'éthyle mais de structure différente et nouvelle.

La synthèse des différents résultats, montre nettement que le pouvoir d'inhibition vis-à-vis de l' α -amylase est un caractère spécifique pour chaque extrait qui peut varier selon sa composition et la structure des molécules responsables de l'activité. Ainsi les extraits végétaux sont des préparations obtenues par l'action extractive d'un solvant approprié sur une plante ou une partie de la plante, le plus souvent sèche et broyée. Ils contiennent des composés de la plante solubilisés par le solvant utilisé. Pour une même plante, les méthodes d'extraction et les contraintes techniques conduisent à différents types d'extraits possibles et bien sûr à

différents effets biologiques. Également le rapport drogue/extrait dépend de la qualité de la plante utilisée : si sa teneur en principes actifs est élevée, la quantité de plante mise en œuvre est moindre. Le titre en plante n'est donc pas le seul critère de qualité des extraits.

❖ Étude du pouvoir anti-amylasique

Après avoir confirmé l'existence d'activité inhibitrice pour chaque extrait par le test précédent, nous avons procédé à l'étude de l'activité anti – amylasique; afin de déterminer pour chaque extrait et dans les mêmes conditions réactionnelles le paramètre IC_{50} qui représente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse réactionnelle jusqu'à 50% de sa valeur maximale non – inhibée.

Nous avons également, mesuré le pouvoir anti - amylasique par la même procédure pour trois molécules flavonoïdiques pures : la Quercetine, la rutine et la cathechine, ainsi qu'un antioxydant de synthèse : le BHA et le médicament le plus prescrit pour les diabétiques locaux Gluconova; pour des raisons de comparaisant.

Pour cela, nous avons varié la concentration en inhibiteurs en utilisant trois concentrations différentes d'extraits végétaux en introduisant 100 μ l des différentes concentrations.

Les représentations graphiques de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en extraits, nous ont permis de déterminer les valeurs d' IC_{50} pour chaque extrait que nous avons regroupés dans le tableau III.11.

Tableau III.11. Valeurs des IC₅₀ (mg/ml) des extraits organiques des plantes étudiées vis - à vis de l'α – amylase d'*Aspergillus oryzae*

Plante Paramètre	<i>Asphodelus microcarpus</i>		<i>Bubonium graveolens</i>	<i>Haplophyllum tuberculatum</i>
	Partie aérienne	Partie racinaire		
Hexane				
IC ₅₀	ND	1,40 ± 0,00	ND	ND
Dichloromethane				
IC ₅₀	1,96 ± 0,02	0,03 ± 0,001	0,06 ± 0,00	0,65 ± 0,05
Acétate d'éthyle				
IC ₅₀	1,19 ± 0,00	0,0007 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Ethanol				
IC ₅₀	2,09 ± 0,01	2,30 ± 0,03	2,13 ± 0,09	3,15± 0,03
Méthanol				
IC ₅₀	0,85 ± 0,01	4,3 ± 0,27	0,87 ± 0,02	0,18 ± 0,01
Molécules flavonoïdiques pures				
	Rutine	Quercitine	Cathechine	BHT
IC ₅₀	4,73 ± 0,02	2,64 ± 0,04	2,42 ± 0,04	0,01 ± 0,00
Medicament Gluconova (acarbose)				
IC ₅₀	6,83 ± 0,45 Principe actif: 0.241			

Les valeurs d'IC₅₀, ont variée globalement entre 0, 0007 et 4.3 mg/ml. Nous avons remarqué, que les résultats obtenus ne sont pas espacés, la majorité n'ont pas dépassé 10 mg/ml. D'un autre côté les fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle des racines d'*Asphodelus microcarpus* ont enregistré les plus faibles valeurs 0,03 et 0,0007 mg/ml faisant de celle-ci les meilleures fractions inhibitrices, ceci peut être expliqué par la richesse de cette plante en molécules spécifiques qui sont responsable de l'inhibition de l'α-amylase et ce qui prouve l'existence de molécules a effet inhibiteur très intéressant et ce qui rend ces deux fractions très intéressantes pour d'éventuels isollements de molécules à structures nouvelles.

Les mêmes remarques ont été soulevées après analyse des résultats les IC₅₀ entre les différents solvants. Nous avons constaté que les extraits hexadique et éthanol sont moins actifs

par rapport au extrait dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer leur effet moindre : soit que ces extraits ne contiennent pas assez de composés polyphénoliques en raison du caractère peu polaire, soit que les polyphénols ne correspondent pas à des anti-amylasique aux propriétés intéressantes. Une bonne récupération des composés biologiquement actifs à partir de matériel végétal dépend largement du type de solvant utilisé dans la procédure d'extraction. Les facteurs influençant le choix du solvant sont la quantité de phytochimiques à extraire, le taux d'extraction, la diversités des différents composés extraits, la facilité de manipulation ultérieure des extraits, la toxicité du solvant dans le processus de test biologique (Tiwari *et al.*, 2011).

Et aussi une petite différence de valeurs est remarquée pour un même solvant d'extraction d'une plante à une autre. Ce rapprochement de valeurs dans les deux types d'extraction, est du peut être à l'existence de molécules actives de structure plus au moins rapproché ou ayant le même mécanisme d'action inhibitrice (Złotek *et al.*, 2015)

A vue d'oeil plus les concentrations en phénols augmentent, plus les valeurs des constantes d'inhibition IC_{50} augmente. À travers les résultats obtenus de ce test, nous avons constaté alors que plus la plante est pauvre en matériel phénolique plus sa capacité inhibitrice d'enzyme est forte (cette remarque n'est pas toujours valable). Les résultats obtenus nous informent que l'activité inhibitrice vis-à-vis des de l' α – amylase dépend d'un facteur important, qui est la structure en composés phénoliques et flavonoïdiques dans chaque plante responsables à cette activité.

La majorité de nos extraits ont enregistré de meilleurs IC_{50} par rapport aux médicaments Gluconova. L'acarbose est un fort inhibiteur compétitif de l' α - glucosidase et l' α - amylase, le mécanisme de l'inhibition de ces enzymes a été supposé être en raison de l'anneau cyclohexène insaturé et la liaison glycosidique qui imite l'état de transition pour le clivage enzymatique de liaisons glucosidiques (Yoon et Robyt, 2003). Cependant, on peut déduire que le bon effet inhibiteur de cette enzyme par nos extraits, implique probablement la présence des groupements glucosidiques dans les squelettes phénoliques et / ou flavonoïdiques. Des études récentes ont démontré que les groupes hydroxyles de composés polyphénoliques ont un rôle important dans la promotion de l'activité inhibitrice (Heo *et al.*, 2009). Il a été également démontré que la baisse de l'activité enzymatique dépend de la concentration ainsi que du nombre et de la position des groupes hydroxyles des composés. Ces activités inhibitrices dépendent de la structure des composés phénoliques réagissant avec

les protéines / enzymes et de diverses propriétés des biopolymères tels que le poids moléculaire, la solubilité et la digestibilité *in vitro*. Le mode d'inhibition dépend également de la spécificité du substrat à l'enzyme. L'acarbose, par exemple inhibiteur synthétique a exposé des inhibitions de type incompétitives mixtes et non compétitives quand il est utilisé avec d'autres substrats l'amylose, la maltodextrine et la maltoheptaose (Chethan *et al.*, 2008).

On peut estimer que nos plantes pourraient remplacer ces médicaments de synthèse vue que la majorité des extraits : dichloromethane, acétate d'éthyle et méthanol ont dévoilé une bonne inhibition par rapport aux molécules pures. à condition de faire subir les extraits de nos plantes des tests de toxicité afin de déterminer les doses létales 50 et réaliser plusieurs travaux d'analyse RMN et SM pour en connaître les principes actifs responsables à l'inhibition.

III.4. Tentative d'isolement

Les substances naturelles connaissent un intérêt croissant pour des applications dans de nombreux produits de consommation. En effet, leur utilisation est encouragée car les produits équivalents issus de synthèses chimiques ont, à tort ou à raison, mauvaise presse parmi le grand public. Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical connu depuis bien longtemps. Il existe donc un besoin de production de substances bioactives isolées, concentrées et purifiées, pour une utilisation dans un large champ d'application (cosmétiques, pharmaceutiques, additifs nutritionnels). Ainsi, l'isolement est un processus important dans la recherche de composé phytochimique (Zhang *et al.*, 2018).

III.4.1. Extraction

La partie racinaire d'*Asphodelus microcarpus* a présenté un bon effet inhibiteur sur l' α – amylase comparativement aux autres extraits, notamment l'extrait acétate d'éthyle mais dont les composés sont déjà connus pour leur activité antidiabétique.

Cette observation nous a incité à concentrer notre travail sur l'extrait moyennement polaires des racines d'*Asphodelus microcarpus*, qui a présenté la deuxième meilleure activité anti-amylasique après la fraction acétate d'éthyle. Le choix de l'échantillon à étudier en particulier a ensuite été guidé par un criblage chimique sur plaque CCM qui a permis de mettre en évidence la présence de flavonoïdes et a clairement montré la richesse en composés phénoliques. Tous ces critères réunis nous ont amené à choisir l'extrait dichlorométhane directement du matériel végétal d'*Asphodelus microcarpus*, jamais étudié jusqu'ici.

Vu que l'habitude a toujours pris le chemin des solvants polaires pour l'isolement des molécules inhibitrices d'hydrolase, nous avons voulu prendre un autre chemin « pourquoi ne pas tenter un isolement à partir d'extrait moyennement polaire à savoir le dichlorométhane.

Dans le présent travail, un extrait brut a été préparé à partir du nouvel échantillon de la plante *Asphodelus microcarpus* récolté au mois d'Avril 2019 dans la région de « Oued Morra », wilaya de Laghouat. L'épuisement de la drogue séchée, qui a débuté par dépigmentation et délipidation à l'hexane suivi du dichlorométhane a été réalisé dans un dispositif soxhlet permettant l'extraction d'une grande partie des constituants. L'extrait brut de dichlorométhane obtenue a présenté un aspect poudreux de couleur marron foncé avec une teneur de 0.22% pour 700 g de poudre. En comparant cette teneur à celle obtenue par macération, nous remarquons une diminution de rendement, ceci est du peut être au fait qu'une masse plus importante de la plante nécessite plus de cycles de lavage au solvant, cette durée prolongée d'exposition à la chaleur a dû agir négativement sur le rendement. Ceci peut être expliqué par le fait que dans l'extraction par macération, la poudre végétale est maintenue en contact avec le solvant dans un flacon bouché pendant une période définie en agitant fréquemment jusqu'à ce que la matière soluble est dissoute où il n'y a aucune influence de température. Par contre une extraction au Soxhlet est nécessaire uniquement lorsque le composé désiré a une solubilité limitée dans un solvant et l'impureté est insoluble dans ce solvant. Si le composé désiré a une haute solubilité dans un solvant puis, une filtration simple peut être utilisé pour séparer le composé de la substance insoluble mais vue l'exposition en continue à la chaleur, cette méthode ne peut être utilisée pour les composés thermosensibles que le chauffage prolongé peut entraîner une dégradation des composés (Tiwari *et al*, 2011).

III.4.2. Fractionnement sur colonne ouverte

Les tubercules d'*Asphodelus microcarpus* possède plusieurs caractéristiques qui rendent leur étude approfondie très intéressante

- Aucune étude d'activité inhibitrice d' α - amylase n'a été effectuée sur cette espèce
- Aucun travail phytochimique antérieur d'isolement n'a été réalisé sur cette espèce;
- Les effets biologiques des différents extraits de cette espèce notamment celui du dichlorométhane laissent présager la découverte de composés non encore répertoriés dans l'espèce.

La méthode généralement utilisée en première intention pour le fractionnement d'extraits bruts ou de fractions complexes est la chromatographie sur colonne ouverte. Les mécanismes de séparation sont les mêmes que ceux qui ont été décrits pour la CCM. La taille de la colonne, la granulométrie de la phase stationnaire et la composition initiale de la phase mobile sont déterminées d'après la quantité et la qualité de l'échantillon à fractionner (extrait brut ou fraction enrichie) et au moyen d'analyses CCM préalables. Dans le présent travail, la phase stationnaire est du Silicagel.

Le conditionnement manuel d'une colonne (Figure III.1) commence par le dépôt d'un coton hydrophile dans l'embouchure d'écoulement. La phase stationnaire est mise en suspension dans l'éluant de départ et versée dans la colonne en plusieurs fois jusqu'à stabilisation au niveau désiré. L'échantillon à fractionner est solubilisé dans un petit volume d'un solvant bien déterminé, puis déposé soigneusement à la surface du gel de silice. Le tout est ensuite recouvert d'un important volume du solvant éluant de départ.

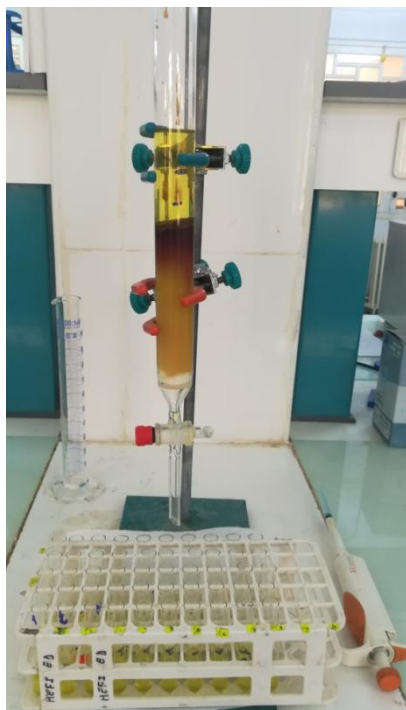


Figure III.1 : Fractionnement sur colonne ouverte

Une prise de 1g d'extrait dichloromethane a été séparée sur colonne ouverte de Silicagel avec une élution en gradient par palier. Les phases mobiles utilisées dans ce travail sont successivement des mélanges binaires à base d'hexane et d'acétate d'éthyle 90:10, 80:20, 70 :30 et 60 :40.

La composition de l'éluant de départ est déterminée par analyse CCM, en essayant de faire migrer les substances d'intérêt un R_f raisonnable. L'élution se fait en mode gradient et les dernières fractions sont lixiviées avec l'acétate d'éthyle et le méthanol. Le débit été toujours constant 2 ml/min .

Les fractions sont récupérées dans des tubes à essai disposés sur un collecteur. L'analyse par CCM (Figure III.2) du contenu des tubes permet finalement de réunir rationnellement 24 fractions (Tableau III. 13) avant d'éliminer les solvants à l'étuve.



Figure III.2. Analyse des fractionnements par CCM

Tableau III.12. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne ouverte de l'extrait Dichlorométhane des tubercules d'*Asphodelus microcarpus*.

Lot de fractions	Système d'élution	Numéro de la fraction	Aspect	Couleur	Nombre de spots	Masse de la fraction (mg)	Teneur (%) « par rapport à l'extrait brut »
1 – 5	90:10	F1	Pâteux	Jaune	1	18,8	1,8
6 – 30	80:20	F2	Pâteux	Jaune	1	27,3	2,7
31 – 39		F3	Pâteux	Jaune foncé	2	4,5	0,45
40 – 55		F4	Pâteux	Jaune	Plusieurs	15	1,5
56 – 70	70:30	F5	Pâteux	Jaune	4	23,7	2,37
71 – 77		F6	Pâteux	Jaune foncé	5	8,4	0,84
78 – 85		F7	Pâteux	Jaune	6	11	1,1
86 – 99		F8	Pâteux	Vert claire	7	11	1,1
100 – 105		F9	Pâteux	Vert claire	7	3,7	0,37
106 – 109	60:40	F10	Pâteux	Vert claire	3	2,7	0,27
110 – 117		F11	Pâteux	Vert olive	4	2,9	0,29
118 – 132		F12	Pâteux	Vert olive	5	5	0,5
133 – 136		F13	Pâteux	Maron claire	5	2,1	0,21
137 – 145		F14	Pâteux	Maron claire	6	3,5	0,35
146 – 155		F15	Pâteux	Maron claire	6	3,1	0,21
156 – 163	100% acétate d'éthyl	F16	Pâteux	Maron foncé	2	3	0,3
164 – 168		F17	Pâteux	Maron foncé	3	1,3	0,13
169 – 177		F18	Pâteux	Maron foncé	4	7,5	0,75
178 – 187		F19	Pâteux	Maron foncé	Plusieurs	33,7	3,37
188 – 200		F20	Pâteux	Maron foncé	Plusieurs	55	5,5
201 – 205		F21	Pâteux	Maron foncé	Plusieurs	17,7	1,77
206 – 215	100% méthanol	F22	Pâteux	Maron très foncé	2	28	2,8
216 – 235		F23	Pâteux	Maron très foncé	Plusieurs	247	24,7
236 – 255		F24	Pâteux	Maron très foncé	Plusieurs	40,2	4,02

Après passage de l'extrait dichlorométhane au travers de la colonne, nous avons disposé aux départ de 256 fractions dont de 156 à 205 et de 206 à 255 sont obtenus suite à un lavage de la colonne par un seul solvant l'acétate d'éthyle et le méthanol respectivement les autres sont obtenues du passage des mélanges binaire hexane / acétate d'éthyle.

Des chromatographies sur couches minces (CCM) préliminaires ont été menées sur les 24 fractions de l'extrait dichlorométhane pour avoir un aperçu de la nature des constituants que l'on peut rencontrer chez cette espèce et pour pouvoir réunir les 24 fractions.

La masse des fractions varie globalement entre 1.3 et 247 mg, les meilleures masses ont été enregistrées pour les fractions éluées au mélange binaire 90 :10 ,80 :20, 70 :30. Contre de très

faibles masses élué par les solvants purs. L'extrait dichlorométhane est un extrait peu polaire et d'après ces résultats on peut dire molécules peu polaire existant dans cet extrait ont été éluée par le mélange binaire peu polaire expliquant ces masses élevées.

Une partie de chaque fraction, a été déposée sur une plaque de CCM ensuite éluées dans les systèmes de solvants décrits auparavant et révélés sous lampe UV à 254 nm pour permettre une première orientation sur les classes de composés présentes dans les échantillons à analyser. La détection des flavonoïdes est généralement réalisée sous la lumière UV à 254 nm ou à 366 nm (selon le type de la structure, les flavonoïdes montrent une fluorescence jaune foncé, vert ou bleu) (Waksmundzka – Hajnos *et al*, 2008).

Les flavonoïdes apparaissent comme des taches sombres sur un fond vert fluorescent, quand on les observe à la lumière UV (254 nm) sur des plaques contenant un indicateur fluorescent aux UV (tel que le gel de silice F254). En 365 nm à la lumière UV et selon le type de construction, les flavonoïdes montrent une fluorescence jaune foncé, vert ou bleu qui est intensifiée et modifiée par l'utilisation de réactifs de pulvérisation (Andersen, 2006).

Les polarités des polyphénols varient de polaire à non polaire, l'extraction optimale des polyphénols est généralement obtenue dans le solvant polaire. Les flavonoïdes moins polaires (par exemple , les isoflavones , les flavanones , les flavones méthylés , et les flavonols) sont extraites avec du chloroforme , le dichlorométhane , l'éther diéthylique , ou l'acétate d'éthyle ; tandis que les flavonoïdes glycosidées et les aglycones plus polaires sont extraits avec des alcools (Méthanol) ou mélanges alcool - eau. La majeure partie des extractions de matériaux contenant des flavonoïdes sont encore réalisées par extraction directe par solvant simple (Andersen, 2006). De ce fait une procédure pratique d'extraction par solvant séquentiel est souvent utilisée. Une première étape, avec du dichlorométhane , par exemple, permettra d'extraire des flavonoïdes aglycones et du matériel moins polaire . Une étape ultérieure avec un alcool va extraire les flavonoïdes glycosidées et les constituants polaires (Andersen, 2006).

III.4.3. Effet des fractions sur l' α - amylase

Les 24 fractions récupérées ont également été soumises au test biochimique, afin de déterminer leur potentiel bioactif. Ces tests sont décrits en détail dans la partie expérimentale, permettent d'évaluer l'activité inhibitrice vis-à-vis de l' α – amylase.

Le Tableau III. 14, présente les résultats du test d'inhibition opéré sur les 24 fractions. L'appréciation des activités a été faite sur la base d'aucune échelle relative. Elle a donc une valeur plus absolue que comparative.

Tableau. III.13. Taux d'inhibition des 24 fractions de l'extrait dichlorométhane de la patie racinaire de la plante *Asphodelus microcarpus* vis - à vis de l' α - amylase.

Numéro de la fraction	Taux d'inhibition (%) vis - à vis de l' α - amylase	Numéro de la fraction	Taux d'inhibition (%) vis - à vis de l' α - amylase
F1	18,25 $\pm$ 1,06	F13	12,25 $\pm$ 0,35
F2	8,85 $\pm$ 2,33	F14	/
F3	15,76 $\pm$ 0,36	F15	/
F4	32,55 $\pm$ 1,45	F16	/
F5	12,2 $\pm$ 0,56	F17	9,85 $\pm$ 0,21
F6	5,95 $\pm$ 1,34	F18	10,55 $\pm$,07
F7	19,9 $\pm$ 0,14	F19	/
F8	12,15 $\pm$ 0,77	F20	0,5 $\pm$ 0,70
F9	31,3 $\pm$ 5,01	F21	/
F10	7,9 $\pm$ 0,14	F22	14,45 $\pm$ 2,47
F11	22,15 $\pm$ 2,47	F23	2,55 $\pm$ 1,34
F12	/	F24	0,57 $\pm$ 0,67

Après analyses des résultats, seulement 18 fractions sur les 24 on montré un effet inhibiteur Le vis-à-vis de l' α – amylase avec des valeurs allant de 0,5 à 31,3 %. D'autre part, Aucun taux d'inhibition n'a été enregistré pour les fractions 12, 14, 15, 16, 19 et 21, laissant penser que ces fractions sont pauvres en molécules inhibitrices ou bien au mécanisme d'action et au type de contact molécule isolée et enzyme. Au bien au fait que ces fraction sont encore chargées en composés actifs ou bien un groupe d'une même famille nécessitant d'autre étapes de fractionnement. Cette fraction présentent des molécules dont la structure n'a pas réagit avec l'enzyme.

La fraction F1 qui a montré l'existence d'une seule tache, a présenté une inhibition malgré qu'elle soit faible elle pourrait s'avérer utile pour d'éventuelles analyses de pureté par HPLC et de caractérisation par les méthodes spectroscopiques.

La fraction de dichloromethane a présente une très bonne inhibition d'une valeur d' IC_{50} de 0,03 mg/ml. Après l'isolement et fractionnement, les fractions récupère ont montré de faibles taux d'inhibition ne dépassant pas les 50%, ceci peut être s'expliquer par la disparition du phénomène de synergie et de coopération entre les molécules où deux ou plusieurs produits a effet conjoint exercent un effet plus important que prévu (Apostolidis *et al.*, 2007 ; Chethan *et al.*, 2008). Les études sur les médicaments traditionnels se concentrent souvent sur un seul composé ou une seule cible, ce qui a conduit à l'identification de nombreux composants efficaces. Cependant, dans de nombreux cas, l'efficacité des médicaments traditionnels est souvent le résultat synergique de plusieurs composants, cibles et voies (Houghton, 2009 et Sucher *et al.*, 2014).

III.4.4. Détermination des IC_{50} des meilleures fractions inhibitrices.

Afin de s'assurer des résultats du test précédent et pour avoir plus d'idées sur la composition des fractions, nous avons varié la concentration de meilleure fraction dans chaque système de solvant dont le choix s'est fixé à trois concentrations afin de déterminer leur IC_{50} . Le tableau III.15 résume les valeurs en IC_{50} en mg/ml.

Tableau III.14. Valeurs des IC_{50} en mg/ml des meilleures fractions de l'extrait dichlorométhane des racines d'*Asphodelus microcarpus* vis - à vis de l' α – amylase.

Numéro de la fraction	Systemes	IC_{50}
F1	90:10	$5,17 \pm 0,10$
F4	80:20	$3,78 \pm 0,10$
F9	70:30	$2,63 \pm 0,20$
F11	60:40	$2,83 \pm 0,15$
F18	100% acétate d'éthyle	$5,39 \pm 0,04$
F22	100% méthanol	$3,69 \pm 0,18$

Au regard du tableau précédent les valeurs d' IC_{50} ont varié entre 2,63 et 5,39 g/l, on remarque que les meilleures valeurs IC_{50} enregistre pour les deux fractions F9 et F11 2.63 g/l et 2.83 g/l respectivement, ces deux fraction pourraient être une éventuelle source de molécules pures à activité inhibitrice.

Les fractions F9 et F11 qui avait présenté un très bon taux d'inhibition pour l' α – amylase 31,30 et 22,15 % respectivement ont également montré de faibles valeurs en IC_{50} 2,63 et 2,83 respectivement ainsi ils pourraient être une éventuelle source de molécules pures à activité inhibitrice intéressante.

Il est important de préciser qu'un résultat observé lors de l'évaluation d'un extrait brut ou d'une fraction enrichie est la composante de deux paramètres : l'activité intrinsèque des produits actifs et leur quantité relative dans l'extrait. Par exemple, une activité avérée d'un extrait peut aussi bien être le reflet d'une faible quantité de constituants très actifs que d'une grande quantité de constituants peu actifs. En résumé, les résultats de telles investigations doivent toujours être analysés avec un esprit critique.

Malheureusement, ce test ayant été introduit vers la fin du présent travail, n'a pas permis d'explorer plus loin cette piste. Relevons néanmoins la possibilité d'isolement de molécules à partir d'extraits peu polaires tel que le dichlorométhane jusqu'à présent très peu exploité. Cette étude pourrait aussi expliquer l'activité inhibitrice observée chez les extraits dichlorométhaniques des six espèces analysées au début de l'étude.

Des centaines de publications sur l'analyse des composés phénoliques ont déjà fait leurs apparitions au cours des deux dernières décennies. Néanmoins, il n'existe toujours pas de procédure normalisée disponible pour la préparation des échantillons et l'extraction. Par conséquent, il existe un besoin pour une investigation dans la préparation d'échantillons. Par ailleurs, les méthodologies utilisées pour l'analyse des composés phénoliques n'ont pas été normalisés. En outre, les méthodes HPLC actuellement employées ne permettent pas à elles seules de déterminer la composition de tous les composés phénoliques d'un échantillon à la fois. Ainsi, il est nécessaire de développer des procédures plus robustes d'analyse (combinaison des techniques chromatographiques et spectroscopiques) pour la détermination simultanée de sous-classes importantes de composés phénoliques et les molécules responsables à l'activité inhibitrice des enzymes.

En conclusion, la plante *Asphodelus microcarpus* pourrait constituer une source importante de métabolites actifs avec un important potentiel thérapeutique, très riches en termes de structure et propriétés biologiques dont elle pourrait jouer un rôle très important dans la médecine

moderne. Ainsi, les résultats obtenus à travers cette étude laissent un grand espoir aux personnes atteintes du diabète pour essayer d'y remédier.

III.5. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits organique

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres (Wainsten, 2009 ; Heim *et al.*, 2002)

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent, il faut combiner les réponses de plusieurs méthodes pour tester la capacité de piégeage d'un radical libre et l'activité antioxydante totale d'un extrait de plante. Toutefois, les antioxydants peuvent réduire les radicaux par quatre mécanismes: par transfert d'électron, par transfert d'atome d'hydrogène, par chélation des métaux ou par inhibition des enzymes oxydatives (Djeridane, 2008).

Dans un but de trouver une relation entre activité inhibitrice et activité antioxydante, nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits organiques à polarité croissante des trois plantes *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens* et *Haplophyllum tuberculatum*. La mise en évidence du pouvoir antioxydant de ces extraits, a été réalisée par quatre tests chimiques *in vitro* le test de l'ABTS, le test CUPRAC, le test du DPPH et le test FRAP.

Les résultats ont été exprimés en μ M équivalent de vitamine C par g de matière sèche. Le tableau III.16 rassemble l'ensemble des résultats.

Tableau III.15. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydant des extraits organique par les quatre tests

Plantes	Extrait	ABTS (μM équivalent vitamin C/g MS)	DPPH (μM équivalent vitamine C/g MS)	CUPRAC (μM équivalent vitamin C/g MS)	FRAP (μM équivalent vitamin C/g MS)
<i>A.microcarpus</i> P. Aérienne					
	DCM	1,67 $\pm$ 0,75	26,62 $\pm$ 0,63	3,74 $\pm$ 0,00	0,0522 $\pm$ 0,00
	Acetate d'ethyl	0,77 $\pm$ 1,05	1,80 $\pm$ 1,57	1,90 $\pm$ 0,03	236,952 $\pm$ 4,84
	Ethanol	24,15 $\pm$ 2,74	2,83 $\pm$ 2,28	1,63 $\pm$ 0,15	226,547 $\pm$ 2,38
	Methanol	0,44 $\pm$ 0,36	4,31 $\pm$ 2,58	5,89 $\pm$ 0,07	27,439 $\pm$ 3,59
<i>A.microcarpus</i> P. racinaire					
	DCM	1,54 $\pm$ 1,77	ND	0,69 $\pm$ 0,00	0,0471 $\pm$ 0,00
	Acetate d'ethyl	0,88 $\pm$ 1,12	ND	0,62 $\pm$ 0,02	0,041 $\pm$ 0,00
	Ethanol	6,28 $\pm$ 3,13	0,44 $\pm$ 1,02	0,56 $\pm$ 0,00	0,080 $\pm$ 0,00
	Methanol	5,78 $\pm$ 1,10	2,31 $\pm$ 0,41	0,37 $\pm$ 0,07	0,053 $\pm$ 0,00
<i>A.graveolens</i>					
	DCM	1,78 $\pm$ 5,02	0,05 $\pm$ 1,75	0,77 $\pm$ 0,00	0,1140 $\pm$ 0,00
	Acetate d'ethyl	0,60 $\pm$ 0,14	ND	1,77 $\pm$ 0,05	0,3436 $\pm$ 0,02
	Ethanol	66,5 $\pm$ 2,54	ND	6,27 $\pm$ 0,01	1,5448 $\pm$ 0,00
	Methanol	6,19 $\pm$ 2,05	14,52 $\pm$ 0,58	38,28 $\pm$ 0,03	0,3158 $\pm$ 0,00
<i>H.tuberculatum</i>					
	DCM	4,35 $\pm$ 0,25	3,07 $\pm$ 2,51	0,37 $\pm$ 0,00	0,3836 $\pm$ 0,00
	Acetate d'ethyl	0,59 $\pm$ 0,89	1,45 $\pm$ 1,42	ND	0,1564 $\pm$ 0,00
	Ethanol	31,14 $\pm$ 1,49	11,19 $\pm$ 1,01	3,85 $\pm$ 0,6	0,2813 $\pm$ 0,01
	Methanol	5,97 $\pm$ 0,17	38,37 $\pm$ 0,32	38,20 $\pm$ 0,36	0,6083 $\pm$ 0,02
Les standards					
Vitmine C	-	-	-	-	-
Ac. Gallique	237,63 $\pm$ 2.67	29,57 $\pm$ 1.35	186,38 $\pm$ 5,187	104,281 $\pm$ 0,950	
Quercitine	135,71 $\pm$ 1.13	13,38 $\pm$ 2.54	154,81 $\pm$ 1,930	58,052 $\pm$ 0,458	

ND : non déterminer

La vitamine C est communément reconnue comme un antioxydant naturel majeur dans notre alimentation et se trouve possédant une activité anti-cancérigènes. Sur ces fins, une plus grande attention a été concentrée sur la détermination de la capacité antioxydante totale des composés phénoliques par la capacité antioxydante équivalente à la vitamine C (VCEAC « Vitamin C Equivalent Antioxydant Capacity »). Ce dosage est un dosage très populaire et la valeur est affectée par la comparaison de la capacité anti-oxydante ou de la capacité de piégeage des radicaux d'un antioxydant à celui de la vitamine C (Annegowda *et al.*, 2010). Ce paramètre, est défini donc comme étant la concentration de la solution standard de la vitamine C possédant la capacité antioxydante équivalente à une solution de 1 μM de la substance

étudiée (extrait). Plus la valeur de VCEAC est importante, plus le pouvoir antioxydant des extraits est important (Saha *et al.*, 2008). De ce fait l'activité antioxydante de nos extraits a été référée à celle de la vitamine C en termes d'équivalence.

$$C \text{ (}\mu\text{M équivalent vitamin C/g MS)} = \frac{\text{pente de l'extrait}}{\text{Pente de VC (}\mu\text{M)}} \times \text{Volume de l'extrait}$$

À partir des pentes tirées des graphes (voir annexe), nous avons calculé le paramètre VCEAC pour chaque extrait

Les résultats de l'activité antioxydante des fractions évaluée par la méthode ABTS et DPPH montrent que la majorité des extraits sont doués d'un pouvoir antioxydant.

On note au regard du tableau précédent que les valeurs VCEAC des extraits phénoliques de nos plantes ont varié entre $0.05 \pm 1,75$ et $38.37 \pm 0,32$ μM équivalent de vitamine C/g MS pour le test DPPH dont la meilleure valeur est celui de l'extrait méthanol de la partie aérienne d' *Haplophyllum tuberculatum* et entre $0.44 \pm 0,36$ et $66.5 \pm 2,54$ μM équivalent de vitamine C/g MS pour le test ABTS dont le meilleur valeurs est celui de l'extrait éthanol d' *Bubonium graveolens*.

Les plus forte valeurs ont été enregistrée pour les extrait éthanolique, par contre les valeurs les plus faible ont été enregistrée pour les extraits d'acétate d'éthyle pour les trois plante avec le test ABTS, les meilleures activités antioxydants pour les deux tests ABTS et DPPH sont celles des extraits d' *Haplophyllum tuberculatum*.

Nous avons remarqué, que les extraits de dichloromethane en majorité ont présenté une faible activité vis - à - vis des deux tests DPPH et ABTS comparativement aux autres extraits. Deux hypothèses pourraient être émises pour expliquer leur moindre effet : soit que ces extraits ne contiennent pas assez de composés polyphénoliques à activité antioxydante du fait du caractère peu polaire de dichloromethane; soit que les polyphénols présents ne correspondent pas à ceux donneurs d'un atome d'hydrogène et de ce fait ne possédant pas des propriétés antioxydantes intéressantes.

La majorité des extraits méthanoliques ont montré une bonne activité pour le test DPPH, alors que les extraits éthanoliques ont montré efficacité pour le test ABTS. Une hypothèse pourrait être émise pour expliquer à leurs meilleurs effets : les composés polyphénoliques a activité

antioxydante contre le radical d'ABTS ont un caractère peu polaire de ce fait ils seront en quantité importante dans l'éthanol que les autres solvants et donneront ainsi des meilleurs valeurs. Une autre explication simple à cette différence, est aussi envisageable : la présence de certaines molécules potentiellement actives dans chaque solvant qui interagit avec chaque test différemment fonction de leur structure, la position de la double liaison dans le cycle C ainsi que le nombre et/ou la position des groupements hydroxyles (Marfak, 2003). Ces différences, peuvent être dues également à la nature du solvant et ces propriétés, l'étude de (Dawidowicz et olszowy, 2013) montre que le type d'alcool utilisé influence significativement l'estimation de l'activité antioxydante des composés phénoliques dans le test ABTS un test. L'activité antioxydante augmente avec l'allongement de la chaîne aliphatique dans l'alcool, cela résulte plutôt des changements dans l'énergie de solvation de l'ABTS par les alcools employés que des variations de dissociation des composés phénoliques.

Les extraits été plus réactif avec l'ABTS que le DPPH, due au fait que le test ABTS est un test beaucoup plus sensible que le DPPH. Il est évident que l'interaction d'un antioxydant potentiel avec l'ABTS dépend de sa conformation structurale. Certains composés réagissent très rapidement avec l'ABTS en réduisant un certain nombre de molécules correspondant au nombre de groupes d'hydroxyle disponibles. Cependant, le mécanisme d'action des extraits testés reste plus complexe. Alors, pour une meilleure compréhension des mécanismes réactionnels entre l'ABTS. Et les antioxydants potentiels, il sera intéressant de caractériser les intermédiaires et les produits de cette réaction (Martysiak-Żurowska and Wenta, 2012).

L'ABTS et le DPPH sont les deux méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante les plus utilisées. Toutes deux présentent une excellente stabilité dans certaines conditions de dosage, mais montrent aussi plusieurs différences importantes dans leurs réponses aux anti-oxydants et leurs manipulations. La supériorité du test ABTS sur le DPPH s'explique par le fait que l'ABTS est utilisable sur une large gamme de pH, il est peu coûteux et plus rapide que celui du dosage DPPH. Une autre différence importante est que l'ABTS peut être solubilisé dans une solution aqueuse et dans des milieux organiques, dans les quel l'activité antioxydante peut être mesurée en raison de la nature hydrophile et lipophile des composés dans les échantillons. En revanche, le DPPH ne peut être dissous que dans les milieux alcoolisés (Longhi *et al.*, 2011).

De nombreux travaux de recherche ont fait appel à certains antioxydants standards connus pour leurs propriétés antioxydantes puissantes comme contrôles positifs. Les plus populaires étant la vitamine C à laquelle s'ajoute l'acide gallique et la quercétine (Bouchouka *et al.*, 2012). Nous avons donc étudié la capacité antioxydante de l'Acide gallique et la Quercétine. D'après les valeurs obtenues, on s'aperçoit que tous nos extraits testés ont dévoilé des activités antiradicalaires nettement inférieures à celles déterminées pour les antioxydants standards. On peut dire que la variation de la capacité antioxydante de nos plantes comparativement à celle des antioxydants standards choisis pour l'étude pourrait être due à la teneur et/ou la présence de certaines molécules potentiellement actives de flavonoïdes et / ou phénoliques dans les extraits.

Les meilleurs teneurs en phénols et flavonoïdes sont enregistrées pour les extraits *Asphodelus microcarpus* partie aérienne mais leur activité antioxydante est faible par rapport aux standards surtout le test CUPRAC, alors que une activité très forte des mêmes extraits pour le test FRAP. L'activité des flavonoïdes à piéger les radicaux dépend principalement de leur structure. Il est connu que seuls les flavonoïdes d'une certaine structure, et en particulier les positions d'hydroxyle et de double liaison dans la molécule, déterminent les propriétés antioxydantes ; en général, ces propriétés dépendent de la capacité à donner de l'hydrogène ou un électron à un radical libre (Marfak *et al.*, 2003).

Si on compare les teneurs en phénols avec les résultats de l'activité antioxydante, on remarque que les teneurs en phénols totaux sont inversement proportionnelles avec les résultats des tests antioxydants. Cela suggère que les activités antioxydantes des extraits étudiés ne sont pas liées aux quantités des phénols mais à la structure et la composition en phénols.

L'étude de Złotek *et al.*, 2015, a montré que le nombre d'étapes d'extraction dans la plupart des cas était également un facteur statistiquement significatif affectant le rendement de l'extraction phénolique ainsi que le potentiel antioxydant parce que les différences de structure des composés phénoliques déterminent également leur solubilité dans des solvants de polarité différente. Par conséquent, le type de solvant d'extraction ainsi que les procédures d'isolation peuvent avoir un impact significatif sur le rendement de l'extraction des polyphénols à partir de matériel végétal.

Selon l'étude de Thouri *et al.*, 2017, Les extraits ayant des niveaux plus élevés de phénols totaux, présentent également une plus grande activité antioxydante. Il est conclu que le changement de polarité du solvant influence dissolution de certains composés antioxydants et l'estimation de l'activité antioxydante. Le changement de polarité du solvant modifie sa capacité de dissolution d'un groupe sélectionné de composés antioxydants et influence l'estimation de l'activité antioxydante.

Ainsi et comme indique l'étude de Nia *et al.*, 2015, la concentration en composés phénoliques n'est pas le seul facteur lié à l'activité antioxydante, mais que l'activité antioxydante des composés phénoliques dépend également de leur structure, en particulier du nombre et de la position des groupes hydroxyle et de la nature des substitutions sur les cycles aromatiques.

Au regard du tableau précédent, nous remarquons que les valeurs VCEAC varient $0,37 \pm 0,07$ et $38,28 \pm 0,03$ pour le test CUPRAC et entre $0,047 \pm 0,00$ et $236,95 \pm 4,8$ pour le test FRAP. Nos extraits phénoliques ont présenté des propriétés antioxydantes pas très intéressantes qui se sont manifestées par des valeurs largement inférieures à un et de ce fait une activité faible par rapport à la vitamine C. La capacité antioxydante totale mesurée par ces deux tests est basée sur la chélation de métaux par transfert d'électrons qui dépend de la structure de l'antioxydant, qui dépend de la structure de l'antioxydant. Ces méthodes détectent habituellement des antioxydants tels que l'acide ascorbique, BHA, BHT, trolox, l' α -tocophéroletc Ces activités antioxydantes proviennent peut-être de la pauvreté de nos extraits en ces composés ou bien contiennent des composés avec des structures non favorables au transfert d'électrons (Bedlovicová *et al.*, 2020).

Cependant quatre extraits se sont révélés meilleurs que la vitamine C avec des valeurs de VCEAC supérieures à 1 qui sont : l'extrait éthanol et méthanol de *Bubonium graveolens* et d'*Haplophyllum tuberculatum* et les extraits méthanol, éthanol et acétate d'éthyle de la partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus*.

Comparativement au standard antioxydant, l'activité enregistrée pour les extraits éthanol et acétate d'éthyle de la partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus* est largement supérieure.

Si on compare entre les deux tests CUPRAC, FRAP, Nous pouvons constater que le test de CUPRAC a donné des valeurs supérieures que celles des tests FRAP. Ces différences peuvent être dues aux différences des milieux réactionnels dans les tests, en effet le test de

FRAP est réalisé dans un milieu acide alors que celui du CUPRAC est dans un milieu à pH neutre qui est proche au pH physiologique.

On comparant entre les quatre tests, on s'aperçoit que la majorité des extraits ont présenté des activités antioxydante pour les tests ABTS et DPPH un écart important que les tests FRAP et CUPRAC ; ceci peut être expliqué par les mécanismes réactionnels des molécules antioxydantes présentes dans nos extraits qui semblent agir de façon préférentielle par transfert de protons ou par transfert d' e^- . Par ailleurs, l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants.

L'un des objectifs thérapeutiques de premier ordre pour un équilibre glycémique et de limiter la production des radicaux libres. Dans l'espoir de trouver l'existence d'une relation entre l'activité antioxydante et la capacité inhibitrice vis-à-vis de l' α – amylase, nous avons comparé les résultats de l'activité antioxydante à ceux de l'activité inhibitrice et nous avons remarqué que les extraits des racines d'*Asphodelus microcarpus* qui se sont montrés de forts inhibiteurs vis-à-vis de l' α - amylase sont les plus faibles en activité antioxydante pour les quatre tests. Cette absence de corrélation est due peut-être au fait que les molécules responsables de l'activité antioxydante sont différentes des molécules à activité. Ceci démontre une différence de mécanismes d'action d'un extrait pour chaque activité biologique.

Les différentes méthodes pour mesurer les activités antioxydantes diffèrent dans leurs mécanismes de réaction, dans la substance cible sur laquelle ils agissent, les conditions dans lesquelles elles sont réalisées et la manière dont les résultats sont exprimés. Ces méthodes sont utilisées dans différents domaines tels que la physiologie, la pharmacologie, la nutrition et la science des aliments, ce qui rend difficile le choix le plus approprié des méthodes, et de fournir l'interprétation correcte des résultats. Par conséquent dans cette étude, des méthodes bien connues, à faibles coûts et faciles à réaliser ont été utilisées.

Cette étude a montré qu'une seule méthode antioxydante *in vitro* n'était pas possible pour déterminer la capacité antioxydante d'un extrait. Chaque méthode avait un mécanisme différent et le résultat pouvait être différent. Par conséquent, il était important d'utiliser une variété de tests avec différents mécanismes sur l'extrait de la plante pour étudier son potentiel antioxydant. L'activité antioxydante d'un extrait végétal est liée ainsi à la concentration de substances anti-oxydantes dans la plante, le solvant utilisé pour l'extraction et de sa forme de préparation.

CONCLUSION

Les plantes ont toujours constituées un réservoir de nouvelles molécules et métabolites qui peuvent être utilisées comme agents thérapeutiques. L'intérêt porté pour l'extraction et l'étude des activités des extraits de plantes a gagné une importance primordiale durant les dernières décennies. Pourtant les nombreux points acquis restent infimes par rapport au domaine de l'inconnu. Beaucoup de plantes n'ont jamais été étudiées, ou ne l'ont pas été par les méthodes modernes. Il y a là un champ immense d'investigations possibles, étendant et renouvelant sans cesse le domaine de la Matière médicale.

L'Algérie, par la richesse et la diversité de sa flore, constitue un véritable réservoir phylogénétique, avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires. Cependant, la flore médicinale algérienne reste méconnue jusqu'à nos jours, car sur les quelques milliers d'espèces végétales, seules 146 sont dénombrées comme médicinales (Hamel *et al.*, 2018). L'Algérie possède une flore extrêmement riche et variée représentée par des plantes aromatiques et médicinales dont la plupart existe à l'état spontané. La valorisation de ces plantes demeure un domaine de grande importance pour le pays.

Dans cette optique notre étude, avait pour but de mieux connaître les espèces locales de la région de Laghouat au travers l'étude de l'effet inhibiteur d'enzyme et de l'activité antioxydant de leurs métabolites secondaires (composés phénoliques, alcaloïdes et huiles essentielles).

Six extraits aqueux provenant de six espèces spontanées locales (*Ammodaucus leucotrichus*, *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens*, *Cistanche tinctoria*, *Haplophyllum tuberculatum* et *Linaria aegyptiaca*) ont été évalués à l'aide de méthodes de criblage chimique (extraction, dosage des phénols totaux et évaluation d'activité inhibitrice sur l' α - amylase). La première découverte intéressante, déroulant du criblage chimique préliminaire, a été l'existence d'effet inhibiteur de cinq extraits vis-à-vis de l'enzyme choisie pour l'étude l' α - amylase.

Ce criblage chimique a mené à la sélection de trois espèces : *Asphodelus microcarpus*, *Bubonium graveolens* et *Haplophyllum tuberculatum*. Sur ces espèces une extraction par solvants organique à polarité croissante a été effectuée avec une quantification des phénols totaux et des flavonoïdes.

Les extraits obtenus ont présenté le même aspect visqueux et différentes couleur, les teneurs d'extraction ont changé selon l'espèce et le solvant d'extraction avec des valeurs variant entre 1,5 et 7.2 %. Les résultats de la quantification des phénols totaux et des flavonoïdes ont varié entre 0,08 et 3,53 mg EAG/g MS et entre 0,004 et 1.1 mg EQ/g MS respectivement.

À la recherche d'activité inhibitrice des différents extraits hexaniques, dichlorométhanés, acétate d'éthyle, éthanoliques et méthanoliques des trois espèces, nous avons testé leur effet inhibiteur sur l' α - amylase. Nous avons pu prouver *in vitro* à travers cette étude la capacité inhibitrice de ces extraits vis-à-vis de l'enzyme en question avec de faibles valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de mg/ml. Les valeurs de ces paramètres ont varié entre 0,0007 et 4.3 mg/ml.

L'extrait dichlorométhane des racines la plante *d'Asphodelus microcarpus*, qui a montré une activité inhibitrice intéressante pour un extrait peu polaire a été utilisé pour une éventuelle tentative d'isolement, dont le fractionnement préliminaire sur colonne ouverte a permis de recueillir 24 fractions. La majorité de ces dernières ont montré des effets inhibiteurs vis-à-vis l'enzyme, avec des pourcentages d'inhibition variant globalement entre 0,50 et 31,30 %. La fraction F9 issu du système de solvant d'élution hexane/acétate d'éthyle : 7/3 a enregistré la meilleur valeur d'IC₅₀ : 2,63 mg/ml et qui présenteraient une éventuelle fraction pour d'autres analyses approfondies afin d'élucider la structure des principes actifs.

L'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits et de quelques antioxydants commerciaux pris comme références (l'acide gallique, la Quercetine) par quatre tests chimiques *in vitro* : le test de l'ABTS, le test CUPRAC, le test du DPPH et le test FRAP, les résultats sont exprimés en équivalent d'acide ascorbique en calculant le paramètre VCEAC ont décelé des activités antioxydantes nettement inférieures à celles déterminées pour les antioxydants standards avec des valeurs comprises entre 0,05 et 38,37 pour le test DPPH et entre 0,44 et 66.5 pour le test ABTS et variant de 0,37 et 38.2 pour le test CUPRAC et de 0,041 et 236,952 pour le test FRAP.

Cette étude ciblée à grande échelle a certes eu l'avantage de mettre en évidence la très grande diversité structurale de cette classe prometteuse de métabolites, mais malheureusement l'isolement des molécules responsables de ces effets biologiques a presque été considéré comme non accompli.

En perspective à cette étude il sera intéressant d'essayer d'isoler et de caractériser ces inhibiteurs par la combinaison des techniques chromatographiques et spectroscopiques qui

nous permettra de préciser les fonctions métaboliques et de faire une bonne étude de la relation structure chimique de l'inhibiteur et fonction des enzymes.

Des études à l'échelle moléculaire seront nécessaires pour déterminer d'une part les composés actifs qui peuvent être responsables de tels effets et d'autre part pour étudier les activités antioxydantes et hypoglycémiantes *in vivo* des principes actifs afin de déterminer leurs doses préventives et thérapeutiques.

Plusieurs travaux peuvent être envisagés dans ce domaine de recherche. Il faut signaler que la région de Laghouat, a un riche patrimoine de plantes médicinales à l'échelle de la diversité, cependant, peu ont reçu un examen scientifique vis-à-vis de certaines activités biologiques et mériteraient d'être investiguées dans les domaines étudiés ; dans l'espoir d'enrichir les banques de données de référence de la phytothérapie et d'intégrer des plantes locales de la région de Laghouat dans leur grande diversité de profils. Il est également envisageable d'élargir le panel de tests biologiques

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abdul Wakeel, Jan, S.A., Ullah, I., Shinwari, Z.KH., Ming Xu, M., 2019. Solvent polarity mediates phytochemical yield and antioxidant capacity of *Isatis tinctoria*. PeerJ, Inc, volume7

Abogmaza, A., Keer, K.F., Takrizzah, A., Yahya, E.Y., 2020. A Review on the Medicinal and Aromatic Plants Growing in Libya and Their Therapeutic Properties. International Research Journal of Science and Technology, Volume 2, p 327-334

Al Kayali, R., Kitaz, A., Haroun, M., 2016. Antibacterial activity of asphodelin lutea and Asphodelus microcarpus against methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates. Int. J. Phcog. Phytochem. Res. 8 (12), 1964–1968.

Andersen, Ø. M., et Markham, K. R., 2006. Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor & Francis Group. P 1 - 2 – 9 - 11.

Andreucci, A.C., Ciccarelli, D., Desideri, I., Pagni, A.M., 2008 .Glandular Hairs and Secretory Ducts of *Matricaria chamomilla* (Asteraceae): Morphology and Histochemistry. Annales Botanici Fennici, volume 45(1), p 11-18.

Annegowda, H. V., Anwar, L. N., Mordi, M. N., Ramanathan, S., and Mansor, S. M., 2010. Influence of sonication on the phenolic content and antioxidant activity of *Terminalia catappa* L. leaves. Pharmacognosy Res, volume 2(6), p 368 – 373

Apostolidis, E., Kwon, Y. I., Shetty, K., 2007. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type II diabetes and hypertension. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol* 8, 46 -54.

Arulselvana, P., Abdul Ghofar, H.A., Karthivashana, G., Abdul Halima, M.F., Abdul Ghafar, M.S., Fakurazi, S., 2014. Antidiabetic therapeutics from natural source: A systematic review. Biomedicine & Preventive Nutrition, volume 248, p 1-11

Bahman, N., Azadeh, A., et Mohammad, K., 2008. Evaluation of the Antioxidant Properties of Five *Mentha* Species. Iranian Journal of Pharmaceutical Research , volume 7 (3), p 203-209

Bahorum, T., 1997. Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle, Journal of Food and Agricultural Research, p 83 - 94.

Bedlovicová, Z., Strapá, I., Baláž, M., Salayová, A., 2020. A Brief Overview on Antioxidant Activity. Determination of Silver Nanoparticles. Molecules, volume 25, n 3191

Bekhaoua, A., Bensayeh, N., 2015. Evaluation de l'activité antioxydante et étude de l'effet inhibiteur sur l' α -amylase de quelques plantes antidiabétiques. L'obtention du diplôme de Master en Biologieoption : Biochimie des produits naturels

Benarous, K., Bombarda, I., Iriepa, I., Moraleda, I., Gaetan, H., Linani, A., Tahri, D., Sebaa, M., Yousfi, M., 2015. Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: In silico and in vitro studies. *Journal of Bioorganic Chemistry*, volume 62 pp 1–7

Bensaci Sabrina., 2016. Contribution à l'étude de la vertu thérapeutique des extraits de quelques plantes utilisées dans la médecine populaire de la région d'Ouargla

Biesiada, A., Tomczak, A., 2012. Biotic and abiotic factors affecting the content of the chosen antioxidant compounds in vegetables. *Veg Crop Res Bull*, volume 76(1), p 55-78.

Bouchouka, E., Djilani, A and Bekkouche, A., 2012. antibacterial and antioxidant activities of three endemic plants from algerian sahara. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, volume 11(1) , p 61 - 65.

Boullard, B., 2001. Plantes médicinales du monde : réalités et croyances. Édition ASTEM, p avant propos.

Boutefnouchet, S., Poupon, E., Girard, C., Hennebelle, T., Seguin, E., 2020. Obtention, production et identification des principes actifs d'origine naturelle. *Pharmacognosie*. Editeur : Elsevier Masson

Bouxi, H., 2012. Les plantes médicinales et diabète de type 2. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, faculté de médecine et de pharmacie. Fes, p 24

Bouzitouna, A., Ouali, K., Djeddi, S., 2015 .Protective Effects of *Cistanche tinctoria* Aqueous Extract on Blood Glucose and Antioxidant Defense System of Pancreatic β -cells in Experimental Diabetes in Rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, volume 40, p 243-249

Brand-williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittelwissenschaft Technol*, volume 28, pp 25-30

Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S., Vasson, M - R, Hesselmann, M., Leverve, X., 2007.Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Troisième édition Springer - Verlag, p 252 – 253.

Chabrier, J.P., 2010. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Sciences pharmaceutiques.

Chang, L.T., Lin, Y., Bartolome, A.P. Chen, Y., Chiu, S., Yang, W., 2013 .Herbal Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus: Chemistry, Biology, and Potential Application of Selected Plants and Compounds. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 378657,p 33

Chaoua, H., Khacheba, I., Boussoussa,H., Bekhaoua, A.,Yousfi, M., 2019. A Potent *In Vitro* α -Amylase Inhibitory Action of *Haplophyllum tuberculatum* Extracts. *Current Enzyme Inhibition*, volume 15, p 1-6

Chehma, A., 2006. Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Université de kasdi Merbah, Ouargla.

Chermat, S., Gharzouli, R., 2015. Ethnobotanical study of medicinal flora in the north east of Algeria - an empirical knowledge in Djebel Zdim (Setif). J. Mater. Sci. Eng, volume 5, p 50–59.

Chethan, S., Sreerama, Y., Malleshi, N., 2008. Mode of inhibition of finger millet malt amylases by the millet phenolics. *Food Chem*, volume 111, p187 - 191.

Chhetri, H. P., Yogol, N. S., Sherchan, J., Anupa K.C., Mansoor, S., Thapa, P., 2008. Phytochemical and antimicrobial evaluations of some medicinal plants of nepal. Nepal journal of science, Engineering and Technologing, volume 1 p 49- 54.

Cornich-bowden, A., Jamin, M., Saks, V., 2004. Cinétique enzymatique . Grenoble Sciences, Portland Press, Ltd. London.

Daouda, M.T., 2014 . etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques medicinales de Côte D'ivoire. Thèse Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de L'Université Félix Houphouet-Boigny En Biologie Humaine Tropicale. Option : Biochimie

Dawidowicz, A., olszowy, M., 2013.The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay. European food research and technology, volume 236, p 1099–1105

Delattre, J., Beaudeau, J.L., Bonnefont, R., 2005. Radiacux libres et stress oxydant aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC and DOC éditions médicales internationales. Paris. 1- 405.

Dioguardi, M., Campanella, P., Cocco, A., Claudia Arena, C., Malagnino, G., Sovereto, D., Aiuto, R., Dioguardi, A., Khrystyna Zhurakivska, K., Muzio, L.L., 2019 .Possible Uses of Plants of the Genus *Asphodelus* in Oral Medicine. *Biomedicines* , volume 7, p 67

Djeridane, A., 2008. Evaluation du pouvoir antioxydant et de l'inhibition d'enzymes (la Carboxylestérase et l'Acylase) par des extraits phénoliques de dix-neuf plantes médicinales locales. Docteur en sciences, option : Chimie moléculaire. L'école Normale supérieure de Kouba-Alger

Djeridane, A., Hamdi,A., , Bensania,W., Cheifa ,K., Lakhdari ,I.,Yousfi, M., 2013. The in vitro evaluation of antioxidative activity, a-glucosidase and a-amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, volume 359,pp 8

Dygert, S., Li, L. H., Florida, D., Thoma, J. A., 1965. Determination of reducing sugar with improved precision. *Analytical Biochemistry*, volume 13, pp 367–374

El Blidi Lahssen, 2006. Synthèse chimioenzymatique et évaluation d'inhibiteurs potentiels de glycosidases, analogues de la valioline. THESE de doctorat, Spécialité : chimie organique et biologique

Es-Safi, N., 2012. Plant Polyphenols: Extraction, Structural Characterization, Hemisynthesis and Antioxidant Properties. *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. P 181 - 206

Ferhat, M., 2012. Métabolites secondaires de *Linaria Aegyptiaca*. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de MAGISTER, Spécialité : Chimie Organique

Fraga-Cesar G., 2010. Plant phenolics and human health *Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey in Canada, p 2-610

Ghoneima, M.M., Maa. G., El-Helad, A.A., Mohammadd, A.I., Kottobd, S., El-Ghalyd, S., Cutler, S.J., Rossa, S.A., 2013. Biologically Active Secondary Metabolites from *Asphodelus microcarpus*. *Natural Product Communications* 8(8), 1117-1119.

Giacco,F., Brownlee, M.,2010.Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Journal of American Heart Association*,volume 9, p 1058-1070

Grover, J.K., Vats, V., Yadav, S., 2002. Medicinal plants of India with antidiabetic properties. *J Ethnopharmacol* , 81: 81-100.

Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow, Molecular aspects of medicine, 27 : 1-93.

Hachani, S., Hamia, C., Boukhalkhal, S., Artur, M.S., Djeridane

, A., Yousfi, M., 2018. Morphological, physico-chemical characteristics and effects of extraction solvents on UHPLC-DAD-ESI-MSn profiling of phenolic contents and antioxidant activities of five date cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) growing in Algeria. NFS Journal, volume 40, 5-18

Haddouchi, F., Chaouche, T.M., Halla, N., 2016. Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie Phytochemical screening, antioxidant activities and hemolytic power of four Saharan plants from Algeria. Phytothérapie, volume 8

Haddouchi, F., Chaouche, T.M., Zaouali, Y., Riadh Ksouri, R., Attou, A., Benmansour, A., 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria, Food Chemistry, volume 141, p 253–258

Hamdi, A., Viane, J., Mahjoub, M.A., Majouli, K., Gad, M., Kharbach, M., Demeyer, K., Marzouk, Z., Vander Heyden, Y.V. 2017. Polyphenolic contents, antioxidant activities and UPLC–ESI-MS analysis of *Haplophyllum tuberculatum* A. Juss leaves extracts. International Journal of Biological Macromolecules, volume 8.

Hamel, T., Sadou S., Seridi, R., Boukhdi, r S., Boulemtafes, A., 2018. Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'edough (nord-est algérien). Ethnopharmacologia, volume 59, p 75-81

Handa, S.S., Khanuja, P.S., Longo, G., Rakesh, D.D., 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology

Handjieva, N.V., Emilia L Dieva, E.L., Spaasov, S.L., Popov, S.S., 1993. Iridoid Glycosides from *Linaria* Species. Tetrahedron, volume 49, p 9261-9266.

Haq, I., 2004 .Safety of medicinal plants. Pakistan J. Med. Res, Volume 43.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D., 2002 . Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The journal of Nutritional Biochemistry. 13, 572-584.

Heo, S., Hwang, J., Choi, J., Han, J., Kim, H., Y. Jeon, Y., 2009. Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, volume 615, no. 1-3, pp. 252–256

Houghton, P., 2009. Synergy and polyvalence: paradigms to explain the activity of herbal products

Jain, C., Khatana, S., Vijayvergia, R., 2019. Bioactivity of secondary metabolites of various plants : a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Volume 10(2), p 494-504. (Jain *et al.*, 2019)

Jones, W.P., Kinghorn, A.D., 2005. Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI (eds) *Natural Products Isolation*, vol 20. *Methods in Biotechnology*. Humana Press, Totowa, pp 323-351

Kadde, S.E., 1990. Les plantes médicinales en Algérie. In: Bouchene, Oued Zenati (Ed.).

Kandra, L., Guémant G., Zajacz, A., Batta, G., 2004. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, volume 319, p 1265-1271.

Kaneria, M., Kanani, B., Chanda, S., 2012. Assessment of effect of hydroalcoholic and decoction methods on extraction of antioxidants from selected Indian medicinal plants. *Asian Pac J Trop Biomed*, volume 2(3), p 195–202

Keillor, J.W., 2004, *Enzymologie inhibition des réactions enzymatiques*, Université de Montréal, faculté des arts et des sciences, département de chimie, P 6, 19, 20.

Keillor, J.W., 2004, *Enzymologie inhibition des réactions enzymatiques*, Université de Montréal, faculté des arts et des sciences, département de chimie, P 6, 19, 20.

Kemassi, A., Darem, S., Cherif, R., Boual, Z., Sadine, S., Aggone, M., Ould elhadj-khallil, A., Ould elhadj, M., 2014. Recherche et identification de quelques plantes médicinales à caractère hypoglycémiant de la pharmacopée traditionnelle des communautés de la vallée du M'Zab (Sahara septentrional Est Algérien). *Journal of Advanced Research in Science and Technology*, volume 1(1), p 1-5.

Khacheba, I., Amar Djeridane, A., Kameli, A., Yousfi, M., 2014 .The Inhibitory Effect of Some Algerian Plants Phenolics Extracts on the α - glucosidase and α - amylase Activities and their Antioxidant Activities. *Current Enzyme Inhibition*, volume 10, p 59-68

Khacheba, I., 2014. Evaluation de l'activité antioxydante et étude du pouvoir d'inhibition sur l' α - amylase et l' α – glucosidase des extraits naturels de la plante *Genista*. Thèse de doctorat, L'école normale supérieure de Kouba - Alger .

Khacheba, I., Boussoussa, H., Djeridane, A., Bekhaoua, A., Bensayah, N., Yousfi, M., 2016. α -Glucosidase Inhibitory Effect and Antioxidant Activity of the Extracts of Eighteen Plant Traditionally Used in Algeria for Diabetes, *Current Enzyme Inhibition*, volume 13, pp1-12

Khacheba, I., Djeridane, A., Yousfi, M., 2014. Twenty Traditional Algerian Plants Used in Diabetes Therapy as Strong Inhibitors of α -Amylase Activity. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, pp1-12

Kitaz A., 2017.Comparison of the Total Phenol, Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of Methanolic Roots Extracts of *Asphodelus microcarpus* and *Asphodeline lutea* Growing in Syria. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, volume 9(2), p 159-164

Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, volume 46, p 244–282

Laoufi, H., 2012. Étude *in vitro* de l'effet de l'extrait de la *Citrullus colocynthis* sur l'activité de l' α -amylase. Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Biologie. Option : Biochimie. Université Abou Bakr Belkaid —Tlemcen.

Lazarovaa, I., Zengin, G., Sinan, K.I., Aneva, I, Uysal, S., Picot-Allain, M., Aktumsek, A., Bouyahya, A., Mahomoodally, M.Z., 2020. Metabolomics profiling and biological properties of root extracts from two *Asphodelus* species: *A. albus* and *A. aestivus*. *Food Research International*, volume 134, p1-9

Lee, K. W., Kim Y. J., Lee H. J. et Lee C. Y. 2003. Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* Volume 51, p7292-7295.

Loh, S.P., et Hadira, O., 2011. *In vitro* Inhibitory Potential of Selected Malaysian Plants Against Key Enzymes Involved in Hyperglycemia and Hypertension. *Mal J Nutr*, volume 17 (1), p 77 - 86.

Longhi, J. G., Perez, E., de Lima, J. J., Cândido, L. M. B., 2011. *In vitro* evaluation of *Mucuna pruriens* (L.) DC. antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, volume 47, n. 3.

Ložienė, K., Venskutonis, P.R., Šipailienė, A., Labokas, J., 2007. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes, *Food Chemistry* 103 : 546–559.

Mahmoudi, S., khali, M. et Mahmoudi, N., 2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus* L.). *Nature & Technologie*, p 35 - 40

Marfak, A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes : étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, p 30 - 40.

Markoma, M., Hasan, M., Wan Daud, W.R., Singh, H., Jahim, J.M., 2007. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, volume 52, 487–496.

Martysiak-Żurowska, D and Wenta W. 2012. A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, volume 11(1), p 83 - 89.

Mayouf, N., Charef, N., Saoudi, S., Baghiani, A., Khennouf, S., Arrara, L., 2019. Antioxidant and anti-inflammatory effect of *Asphodelus microcarpus* methanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, volume 239, 111914

Médart, J., 2009. Manuel pratique de nutrition : L'alimentation préventive et curative. **Édition De Boeck s. a.**, p 46 – 49 – 50 – 51 – 52.

Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*, 31(3), 426-428.

Mojab, F., Kamaline jab, M., Ghaderi, N., Vahidipour, H. R., 2003. Phytochemical Screening of Some Species of Iranian Plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, p 77 - 82.

Mukherjee, P.K., Maiti, K., Mukherjee, K., Houghton, P.J., 2006. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *J Ethnopharmacol*, volume 106, p 1-28.

Nacz, M., et Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, volume 1054, p 95 -111.

Nia, S., Benarous, K., Lakaas, M., Sadeki, I., Yousfi,M.,2020. New Inhibition Detection Method to Evaluate the Human Salivary Alpha-amylase Activity of Some Drugs, Molecular Docking, and SAR Studies. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, volume 19, pp 1-13

Nia, S., Benguechoua, M., Benarous, K., Khacheba, I., Chérif, J.K., Trabelsi-Ayadia , M.,and Yousfi, M., 2015. In vitro evaluation of antioxidant activity of *Ononis angustissima* extracts.

Nia, S., Benguechoua, M., Benarous,K., I Khacheba, I., Chérif, J.K., Trabelsi-Ayadi, M., Yousfi, M., 2014. Screening of Two Algerian Spontaneous Plants for Anti-lipase and Antioxidant Activities. *Current Enzyme Inhibition*, volume 10,pp 113-120

Nickavar, B., Alinaghi,A., Kamaline jad, M., 2008. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, volume 7, no. 3, p 203–209.

Ozenda P (1991): Flore et végétation de sahara (3 édition mise à jour et augmentée) Paris , Editions du CNRS,662p. + cartes.

Ozyurek,M., Guçlu,K., Tutem,E., Basxkan,K., Erol Ercçag, E., Karaman, S., Resat Apak,R. 2011. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical. Methods*, volume 3 pp 2439

Pawar, S.S., Dasgupta, D.,2018 .Quantification of phenolic content from stem-bark and root of *Hugonia mystax* Linn. using RP-HPLC. *Journal of King Saud University –Science*,volume 30, p 293-300

Petrillo, A.D., González-Paramás, A.M., Era, B., Medda, R., Francesca Pintus, F., Santos-Buelga, C., Antonella Fais, A., 2016. Tyrosinase inhibition and antioxidant properties of *Asphodelus microcarpus* extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, volume 16, p 1-9

- Peungvicha, P., Temsirikul, R., Prasain, J., Tezuka, Y., Kadota, S., Thirawarapan, S., Watanabe, H., 1998.** 4-Hydroxybenzoic acid: a hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root, *Journal of Ethnopharmacology*, volume 62, p 79–84
- Phan, M.A., Paterson, J., Bucknall, M., Arcot, J., 2018.** Interactions between phytochemicals from fruits and vegetables: Effects on bioactivities and bioavailability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, volume 58, 1310-1329
- Phan, M.A.T., Wang, J., Tang, J., Lee, Y.Z., Ken, N., 2013.** Evaluation of α -glucosidase inhibition potential of some flavonoids from *Epimedium brevicornum*. *Food Sci. Technol.*, volume 53, p 492-498
- Ponnusamy, S., Ravindran, R., Zinjarde, S., Bhargava, S., Kumar, A.R., 2011.** Evaluation of traditional Indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic amylase inhibitory effect. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 515647, p 10
- Prashant, T., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H., 2011.** Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. Volume 1, p 98-106
- Quettier Deleu, C., 2000.** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat hulls and flour, *Journal of Ethnopharmacology*. volume 72, p 35 - 42
- Quézel, P., 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CRNS, Pris, 194p
- Raissi, A., Arbabi, M., Roustakhiz, J., Hosseini, M., 2016.** *Haplophyllum tuberculatum*: An overview. *J Herbmed Pharmacol*, volume 5, p125-130.
- Ramakrishna, A., et Ravishankar, G. A., November 2011.** Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav.* Volume 6(11), p 1720 -1731.
- Ramdane, F., Essid, R., Mkadmini, K., Hammami, M., Fares, N., Hadj Mahammed, M., El Ouassis, D., Tabbene, O., Limam, F., Ould Hadj M.D., 2017.** Phytochemical composition and biological activities of *Asteriscus graveolens* (Forssk) extracts. *Process Biochemistry*, volume 56, p 186-192
- Ranga, R. R., Tiwari, AK., Reddy, P. P., Babu, S. K., Madhusudana, A. K., et Madhusudana, R. J., 2009.** New furanoflavanoids, intestinal α -glucosidase inhibitory and free-

radical (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam.). Journal of Bioorganic & Medicinal Chemistry, volume 17, p 5170 - 5175.

Réblová, Z., 2012. Effect of Temperature on the Antioxidant Activity of Phenolic Acids. Czech J. Food Sci, Volume 30, p 171 – 177

Refaz, A., Shahnawaz, M., Parvaiz, H. Q., 2017. General overview of medicinal plants: A review. The journal of phytopharmacology, volume 6(6), p 349-35

Roche, M., Rondeau, P., Singh, N.R., Tarnus, E., and Bourdon, E., 2008. The antioxidant properties of serum albumin. FEBS Lett. volume 582. 1783-7.

Saha, M. R., Alam, Md. A., Akter, R. and Jahangir, R., 2008. In-vitro free radical scavenging activity of *Ixora coccinea* L, Bangladesh J Pharmacol, volume 3, p 90 - 96.

Sampaio, B. L., Bara, M. T. F., Ferri, P. H., Santos, S. d C., de Paula, J. R., 2011. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, volume 21, No 6

Sarri, M., Mouyeta, F.Z., Benzianea, M., Cherieta, A., 2014. Traditional use of medicinal plants in a city at steppic character (M'sila, Algeria). J. Pharm. Phcog. Res. 2 (2), 31–35.

Scheen A.J., Letiexhe, M.R., Geronooz, I., Jandrain, N. B., 2002. L Hyperglycémie Post-Principale. Approches thérapeutiques médicamenteuses. Rev Med Liege, volume 57, p 196-201

Sebaa, A., Marouf, A., Kambouche, N., Derdour, A., 2018. Phytochemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Ammodaucus leucotrichus* Fruit From Algerian Sahara. Oriental journal of chemistry, Volume 34(1), P. 519-525

Shahin, S. A., Naresh, K., Abhinav, L., Angad, S., Hallihosur S., Abhishek, S., Utpal, Bora., 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. Journal of Food Research International, volume 41 , p 1 -15.

Sharif, A.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U., 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. Food Research International, volume 41, p 1–15

Shibamoto T, 2014, Measuring the Antioxidant Activity of Food Components in Bartosz G., Food Oxidants and Antioxidants Chemical, Biological, and Functional Properties CRC Press, Etats unis, 550 pages.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin–Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.* Volume 299 ,pp 153–178.

Sucher, N.J., Xi, L., Yiping, Y., Hongjun, Y., Peng, Lu., 2014. Searching for synergy in silico, in vitro and in vivo. *Synergy*, j.synres, 07.004

Szakiel, A., Paczkowski, C., Henry,M., 2011. Influence of environmental biotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochem Rev* , volume 10, p493–502

Telli, A., 2017. étude activités anti-oxydante, antimicrobienne et antidiabétique de deux espèces spontanées utilisées dans le traitement du diabète dans la région de ouargla : *Amondaucus leucotrichus* et *Anvillea radiata*, Thèse de Doctorat, Université de Ouargla, p 12

Thouri, A., Chahdoura, H., El Arem, A., Omri Hichri, A., Ben Hassin, R., Achour, L., 2017. Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arechti). *Complementary and Alternative Medicine*, volume 17, n 248

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H., 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. Volume 1, p 98 - 106.

Tundis, R., Loizzo, M.R., Menichini, F., 2010. Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Rev Med Chem*, volume 10, p315-331

Ullah, A., Khan, A., Khan, I., 2016. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi pharm journal*, volume 24(5), p 547–553

Velickovic D.T., Milenovic D. M., Ristic M. S. et Veljkovic V. B., 2006. Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. *Journal of ultrasonic Sonochemistry*, volume 13, 150 - 156.

Wagner, H., Bladt, S., 1996. *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2nd Edition, Springer-Verlag, Berlin

Wainsten, J. 2009. *Le Larousse Médical*. Paris : Larousse.

Waksmundzka – Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T., 2008. *Thin layer chromatography in phytochemistry*. Taylor & Francis Group. p 5, 82, 104, 408.

Wei, J.N., Liu, Z.H., Zhao, Y.P., Zhao, L.L., Xue, T.K., Lan, Q.k., 2019. Phytochemical and bioactive profile of *Coriandrum sativum* L. Food Chemistry, volume 286, p 260-267

Xiuzhen, H., Tao, S., Hongxiang, L., 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. International Journal of Molecular Sciences, volume 8, p 950-988

Yoon, S. H, et Robyt, J. F., 2003. Study of the inhibition of four α - amylases by acarbose and its 4IV - α - maltohexaosyl and 4IV - α - maltododecaosyl analogues. Journal of Carbohydrate Research, volume 338, p 1969 - 1980.

Zellagui, A., Gherraf, N., Rhouati, S., 2013. A Germacrene –D, characteristic essential oil from *A. microcarpus* Salzm and Viv. Flowers growing in Algeria. Glob. J. Biodivers. Sci. Manag. 3 (1), 108–110.

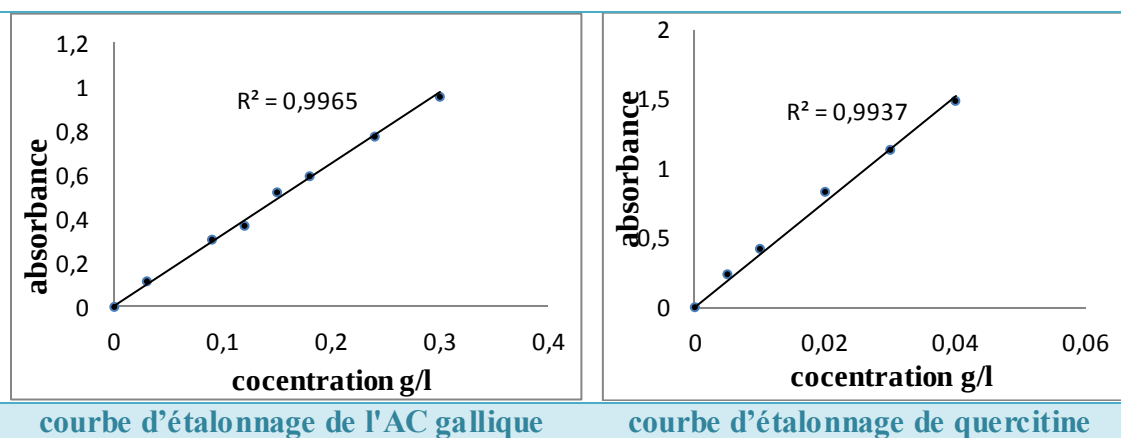
Zhang, Q., W., Lin, L., Ye, W., 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. Chinese Medicine, volume 13 p 20

Ziani, B., Rached, W., Bachari, K., Alves, M.J., Calhelha, R.C., Barros, L., Ferreira, I., 2019. Detailed chemical composition and functional properties of *Ammodaucus leucotrichus* Cross. & Dur. and *Moringa oleifera* Lamarck. Journal of Functional Foods, volume 53, p 237–247

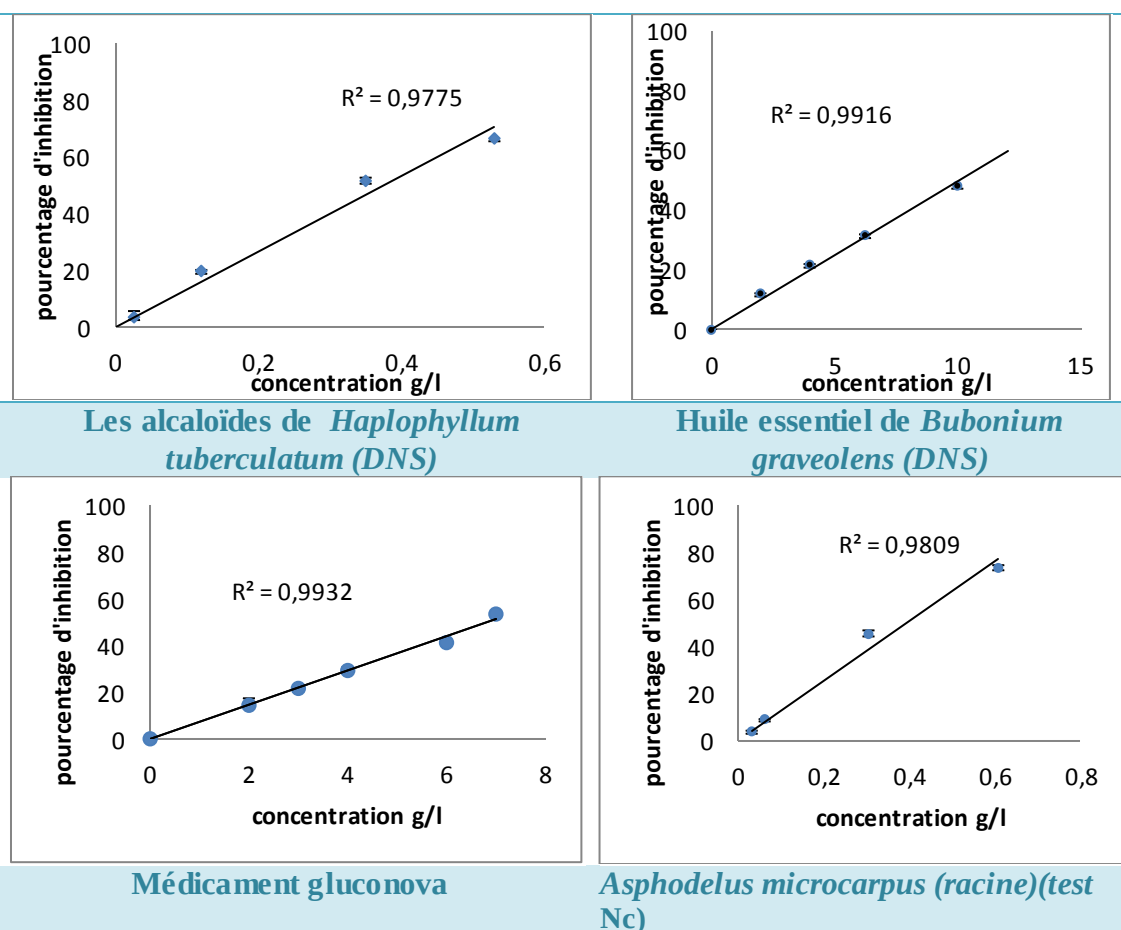
Zlotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M., wieca, M., 2015. The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. Saudi Journal of Biological Science.

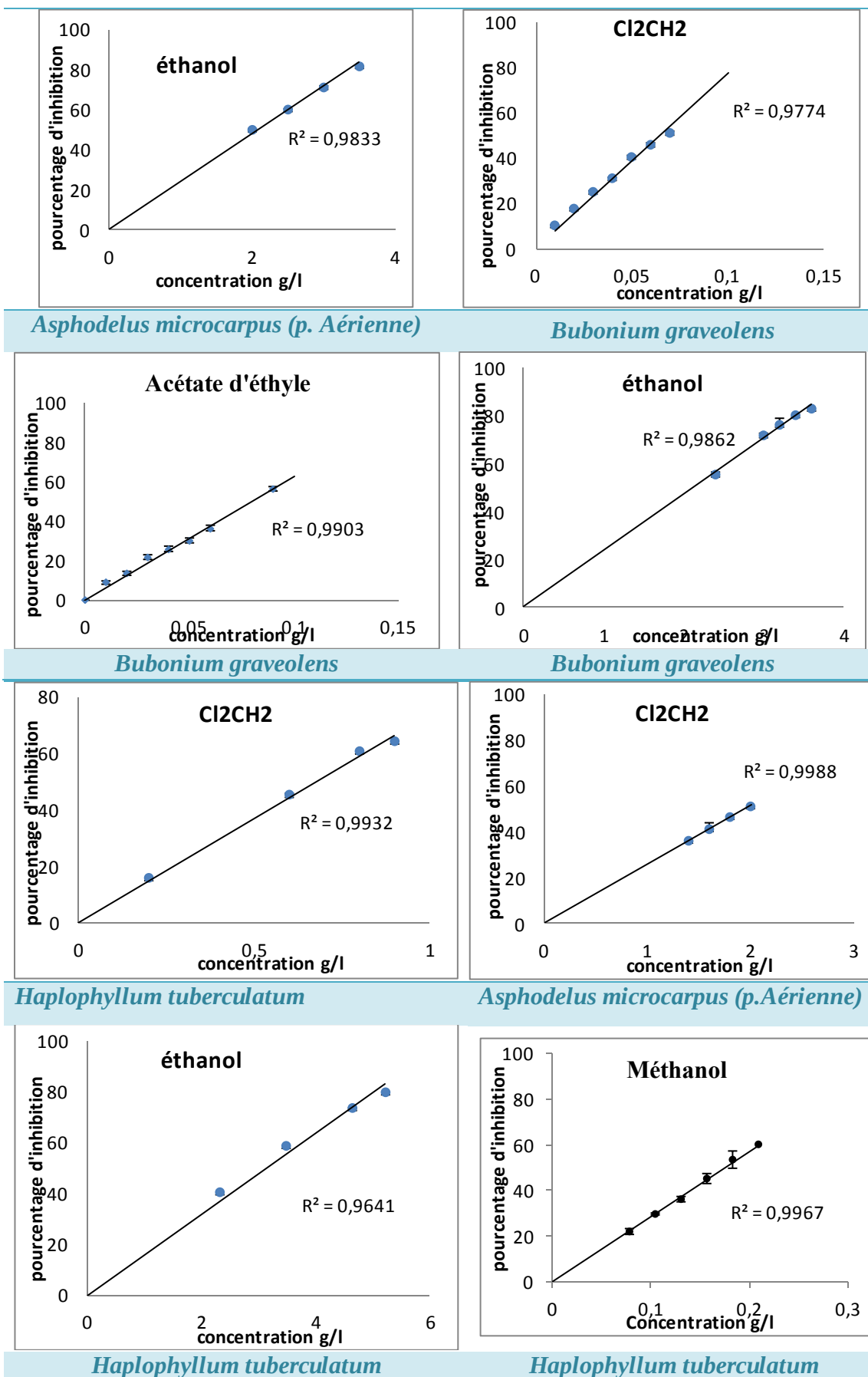
ANNEXES

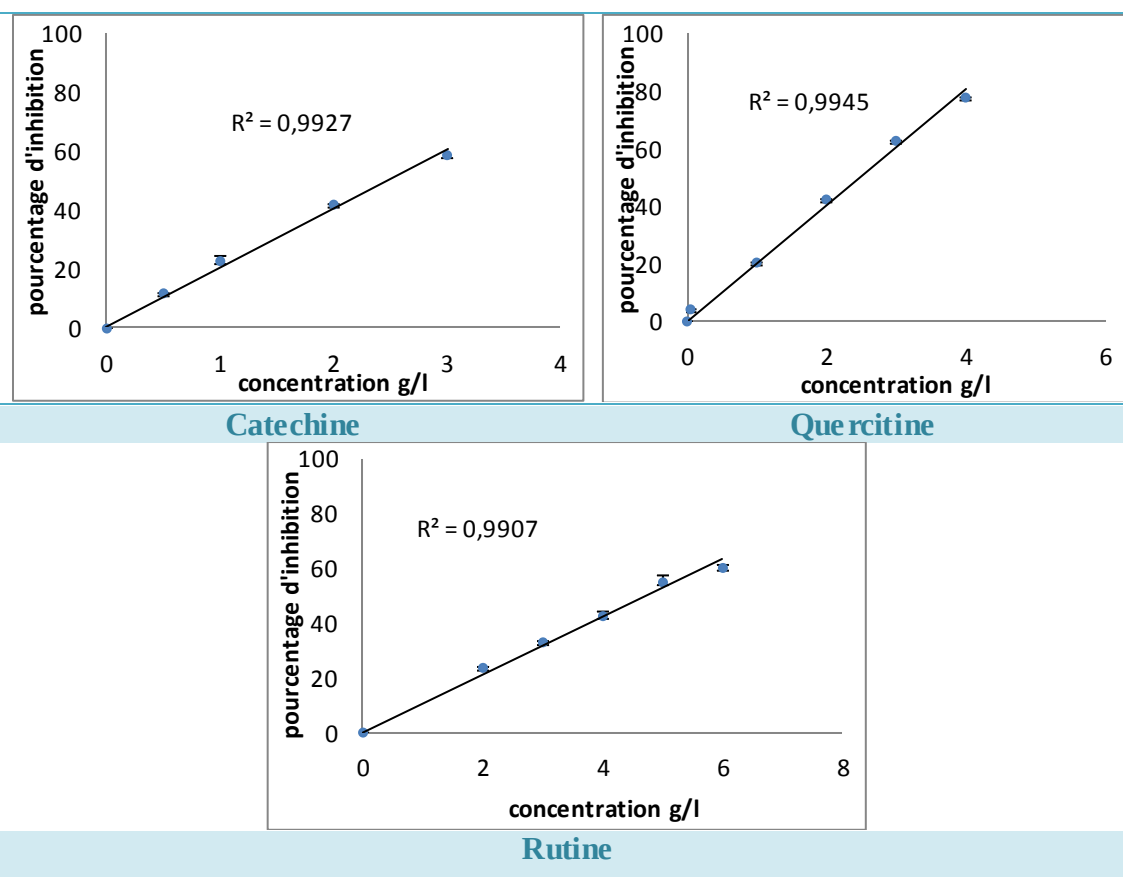
Annexe 1 : Courbes d'étalonnages



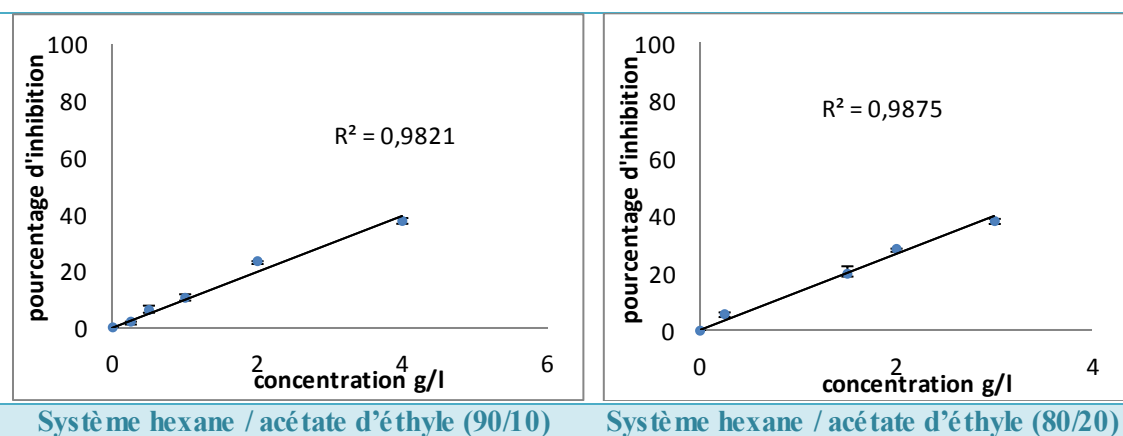
Annexe 2 : Étude du pouvoir anti-amylasique de quelques extraits

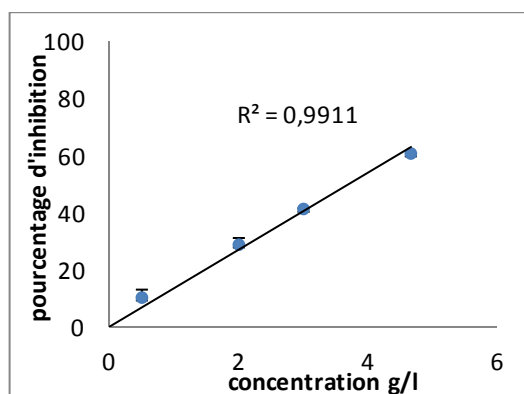






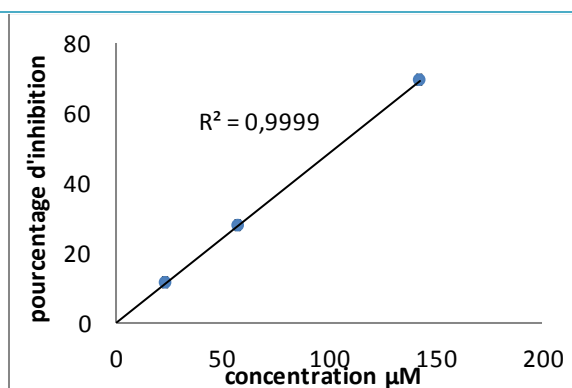
Annexe 3 : Variation du pourcentage d'inhibition de quelques meilleures fractions de l'extrait dichlorométhane de la partie racinaire de la plante *Asphodelus microcarpus* vis - à vis de l' α - amylase



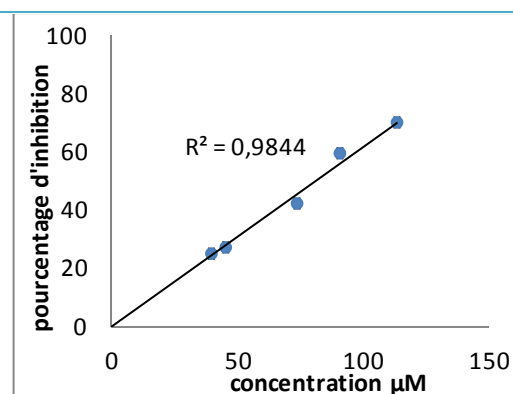


Système 100% méthanol

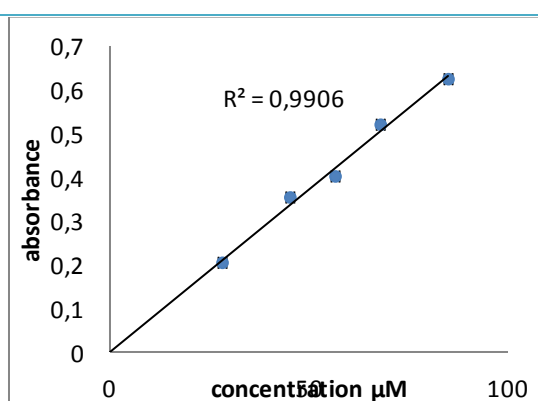
Annexe 4 : Activité antioxydante de vitamine C par les tests ABTS, DPPH, FRAP et CUPRAC.



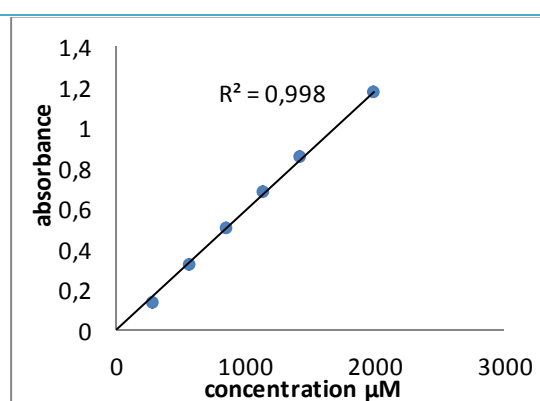
Vitamine C par test ABTS



Vitamine C par test DPPH



Vitamine C par test FRAP



Vitamine C par test CUPRAC

Liste des publications et des communications

Publications

- **Bekhaoua Abir**, Ihcen Khacheba, Hadjer Boussoussa, Mohamed Yousfi. 2019. α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Effect and Antioxidant Activity of Aerial Part from *Linaria aegyptiaca* L, *Current Enzyme Inhibition*, 15, 1 - 6.
- Chaoua Houcine, Khacheba Ihcen, Boussoussa Hadjer, **Bekhaoua abir**, Yousfi Mmohamed, 2019. A Potent *In Vitro* α -Amylase Inhibitory Action of *Haplophyllum tuberculatum* Extracts. *Current Enzyme Inhibition*, volume 15, p 1-6

Une publication est également en préparation

Abir Bekhaoua^a; Ihcen KHACHEBA^a; Hadjer BOUSSOUSSA^a; Housseyn CHOUA^{a,b}, Saliha DAHMANA^b & Mohamed YOUSFI^a. Antioxidant and antidiabetic activity of *Asphodelus microcarpus* tubers extracts on induced type 2 diabetic rats

Communications Internationales

- **Bekhaoua Abir**, Khacheba Ihcen, Boussoussa Hadjer, Segleb Fatiha, Bensayah Noussiba and Yousfi Mohamed. Six Algerian Medicinal Plants Used in Diabetes Therapy as Strong Inhibitor of α -glucosidase Activity. **Séminaire International sur Les Plantes Médicinales**. Université d'El-Oued, les 17 et 18 janvier 2018.
 - **Bekhaoua Abir**, Khacheba Ihcen, Boussoussa Hadjer and Yousfi Mohamed. *In vitro* antidiabetic activity of aqueous extracts of three algerian saharan plants. **The 3rd Africa – International Allelopathy Congress : III AIAC – 2018**. Université Blida 1 - Algérie - . Le 20 - 22 Novembre 2018.
 - Chaoua Housseyn, Khacheba Ihcen, Boussoussa Hadjer, **Bekhaoua Abir**, Yousfi Mohamed. A study on *in vitro* Alpha Amylase inhibition and Antioxidative capacity of *Atractylis delicatula* endemic to Algeria. **4^{èmes} Journées Internationales de Chimie Organique d'Annaba**. Le 1, 2 et 3 Décembre 2018
-

Liste des publications et des communications

Communications Nationales

- **Bekhaoua Abir**, Khacheba IHCEN, Boussoussa Hadjer, Chaoua Housseyn and Yousfi Mohamed Phenolic and flavonoid contents of four Algerian spontaneous plants and their antidiabetic capacity as evaluated by inhibition of α – amylase. **Le 1^{er} séminaire national sur l'environnement et le développement durable**. Centre universitaire de Relizane, **le 14 Octobre 2018**.
 - Seglab Fatiha, Khacheba IHCEN, Chaoua Housseyn, **Bekhawa Abir**, Yousfi Mohamed. Comparison of five evaluation antioxidant activity methods on *Cleome arabica* leaves extracts and there *in vitro* antidiabetic activity in different season. **Le 1^{er} séminaire national sur l'environnement et le développement durable**. Centre universitaire de Relizane, **le 14 Octobre 2018**
 - **Bekhaoua Abir**, Khacheba IHCEN, Boussoussa Hadjer, Chaoua Housseyn and Yousfi Mohamed. Anti-oxidant and Anti-hyperglycemic Properties of *Linaria aegyptiaca* Extracts. **The first National Seminar of Bioactive Molecules : VALORIZATION OF MEDICINAL PLANTS TO COMBAT CELL DAMAGE**. Oum El Bouaghi : **Le 18 et 19 Novembre 2019**
-