

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat

جامعة عمار تليجي - الأغواط -

Faculté des Sciences

كلية العلوم

Département de Biologie

قسم البيولوجيا



MEMOIRE DE MASTER

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie des produits naturels

Présenté par : MAAMRI Anfal, BEN DAHGHANE Hania

Thème

Effet inhibiteur des extraits phénoliques et des saponines des espèces *Cupressus sempervirens* L et *Achillea santolina* sur l' α - amylase.

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Garde	Qualité
M ^{me} . KHACHEBA IHCEN	M.C.A	Rapporteur
M. BENRAMDANE TAYEB	M.A.A	Co-rapporteur
M ^{elle} . BENABED KHADIDJA HOUDA		Présidente
M. GUENANE HAMID		Examineur

Année Universitaire 2016 - 2017

Résumé

Les extraits naturels de plantes contiennent une variété de composés aux quels sont attribuées diverses activités biologiques. Le but de cette étude est d'évaluer *in vitro* l'effet inhibiteur d'extraits (phénoliques et saponines) de deux espèces locales *Cupressus sempervirens L* et l'*Achillea santolina* sur l'activité de l' α -amylase.

Les teneurs en composés phénoliques totaux, dosés dans les différents échantillons en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, ont varié entre 0,081 et 2,59 mg / g en équivalent d'acide gallique. Alors que les concentrations des flavonoïdes détectées en utilisant le chlorure d'aluminium 2% ont varié entre 0,011 et 0,11 mg / g en équivalents de quercétine. Quant au dosage des saponines par la vanilline, les teneurs ont varié entre 14,23 et 131,46 mg/g en équivalent digitonine. Les meilleurs teneurs ont été observées chez l'extrait d'Ac Et (EtOH) de la plante *Cupressus* (Les graines).

La majorité des extraits ont montré des activités inhibitrices vis-à-vis l' α -amylase, avec des valeurs des constantes IC_{50} allant de 0,49 à 1,2 mg/ml, dont la meilleure activité a été enregistrée chez l'extrait saponine de l'espèce *Cupressus sempervirens L* (cônes) avec une valeur de 0,49 mg/ml.

Ces résultats montrent que ces espèces ont un bon potentiel pour la gestion de l'hyperglycémie et suggère qu'elles peuvent être utilisées comme additifs contribuant à l'effet anti-hyper glycémiant. Ces résultats nous encouragent à amplifier plus l'investigation biologique et d'identifier les molécules inhibitrices responsables de cette activité.

Mots clés : Composés phénoliques, flavonoïdes, saponines, effet inhibiteur, α -amylase, *Cupressus sempervirens L* (Cypés), *Achillea santolina* (Achillés)

Abstract

The natural plant extracts contain a variety of compounds, which are attributed a various biological activities. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the inhibitory effect of organic extracts (phenolic and saponin) of two local species *Cupressus sempervirens* L and *Achillea santolina* on the activity of α - amylase.

The total phenolic compounds contents, evaluated in the different samples using the Folin-Ciocalteu reagent, vary between 0,081 and 2,59 mg / g gallic acid equivalent . While the concentrations of flavonoids detected using chloride aluminum 2% vary between 0,011 and 0,11 mg / g quercetin equivalent . Concerning the quantification of saponins contents by vanillin, value have varied between 14,23 and 131,46 mg / g in digitonin equivalent . The best amounts were observed in the Ac ET (EtOH) extracts of *Cupressus sempervirens* L plant.

The majority of the extracts showed inhibitory activities on the α -amylase, with IC₅₀ constants values ranging from 0,49 to 1,2 g/l, the best activity was recorded in the saponin extract of the species *Cupressus sempervirens* L, with a value of 0.49 mg/ml.

These results show that these species have a good potential for hyperglycemia management and suggests that they can be considered as a additive contributing ad effect anti-hyperglycemic. These results encourage us to amplify more biological investigation and identify inhibitory molecules responsible for this activity.

Keywords: Phenolic compounds, Flavonoids, Saponins, Inhibitory effects, α -Amylase, *Cupressus sempervirens* L (Cypés) , *Achillea santolina* (Achillés).

ملخص:

تحتوي المستخلصات النباتية الطبيعية على مركبات فينولية متعددة ذات نشاطات بيولوجية مختلفة، الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثير التثبيطي لمستخلصات عضوية (الفينوليك والصابونين) على نشاط أنزيم الألفا أميلاز.

تم معايرة المحتوى من المركبات الفينولية الاجمالية باستعمال كاشف فولان دينيس, نتائج العينات تراوحت من 0,081 إلى 2,59مغ/مغ مكافئ حمض الغاليك , في حين ان تراكيز الفلافونويدات المكشف عنها باستعمال كلوريد الألومنيوم 2% تتباين بين 0,011 إلى 0,11 مغ/مغ مكافئ الكرسيتين. اما بالنسبة لمعايرة الصابونين باستعمال الفانيلين، تباينت القيم من 14,23 إلى 131,46 مغ/مغ مكافئ الديجيتونين.

ولقد لوحظ بان أفضل قيمة سجلت في المستخلص ايثيل الأستات (ايثانول/ ماء) للنبتة *Cupressus sempervirens L.*,

أظهرت اغلبية المستخلصات نشاط تثبطي لل اميلاز مع قيم IC 50 تراوحت من 0,49 إلى 1,2 مغ/مل في حين ان أفضل نشاط سجل في نبتة *Cupressus sempervirens L* (les cones) بقيمة 0,49 مغ/مل.

هذه النتائج تشير بان هذا النوع من النباتات لديه إمكانية جيدة في التحكم في ارتفاع نسبة السكر في الدم وتقتصر بأنه يمكن ان تعتبر مكملات طبيعية تساهم في تخفيض نسبة السكر في الدم, هذه النتائج تشجعنا على تكثيف البحث البيولوجي و تحديد الجزيئات المثبطة المسؤولة عن هذا النشاط.

الكلمات المفتاحية: المركبات الفينولية، الفلافونيدات، الصوبونيات، النشاط التثبيطي، الأميلاز، *Cupressus sempervirens* (الصرو) , *Achillea santolina* (القيسوم الفواح).

Dédicace

Tout d'abord, louange à « Allah » qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aura pas abouti.

Je dédie ce travail à l'idole dans cette vie, qui m'a enseigné la morale et le dévouement au travail. Pour aimer mon cœur "Mohammed" Messager d'Allah et paix et bénédictions

Ce travail pour vous, c'est la moindre des choses que je fais pour vous

C'est avec respect et gratitude que je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma sympathie à :

- Mes très chers parents, que le bon Dieu leurs accorde tous une longue vie
- Mes grands-parents, qu'Allah nous a honoré de soutenir ce monde surtout ma chère belle mère Mebairika
- A mon très cher mari Youcef Bougrine : Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel m'ont permis de réussir mes études. Ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.
 - Mon cher frère Younes Mohamed Islam
 - Mes chers sœurs, Malika, Arwa, Roufaïda et la fleure Retadj
 - Ma grande famille Maamri, Rabhi et Bougrine
 - Mon binôme « Hania », pour m'aider à compléter cette recherche
 - Toutes mes nièces et tous mes neveux que j'aime beaucoup
 - Tous mes amis (es) et proches,

Anfal

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

Aux êtres les plus chères mes parents

Qui m'ont encouragé et illuminé ma vie par ses conseils

A mes chères frères et sœurs

A ma chère copine Tahiri Khaoula

A tous mes amies de L'EPSP de Laghouat, de laboratoire de Dr Debagha

*Aux nos enseignants, en fin je ne peux finir sans adresser mes remerciements
à Mer Debagha M Médecin Biologiste*

Aux ceux qui m'ont aidé un jour

Haniya

Remerciement

Ce travail a été réalisé au laboratoire pédagogique du département de Biologie de l'Université Amar Telidji – Laghouat - sous la direction de M^{me} KHACHEBA IHCEN et M. BENRAMDANE Tayeb.

Nous tenons à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce mémoire. Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer toute nos reconnaissances et notre profond respect à notre promotrice Madame Khacheba IHCEN et notre Co-promoteur M.

Benramdane Tayeb

Nous les remercions pour le choix du thème, pour leur patience et leurs conseils concernant la partie analytique. Nous avons beaucoup apprécié leur disponibilité et leurs instructions avisés.

Nous tenons à exprimer également nos sincères remerciements à M^{lle} BOUSSOUSSA HADJER pour avoir participé activement à la correction de ce manuscrit. Ses compétences techniques et son efficacité ont fortement contribué à la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de Biologie pour leur convivialité et pour leur disponibilité particulièrement M^{lle}. GHAOUI HALIMA.

Merci à M^{me} MAAMRI MALIKA, M^{me} BENAROUSSE KHADIDJA, M^{me} AICHA HAMDI, M. GOUZI HICHAM et M. BEN NACER FAROUK qui nous ont aidés durant les moments difficiles...

Merci à tous les membres de notre promotion.

A tous nos enseignants depuis nos premières années d'études.

A tous ceux qui nous sont chers et que nous avons omis de citer.

Un grand merci à toutes les personnes qui nous ont soutenus de près ou de loin au cours de la réalisation de ce modeste travail.

Abréviations et symboles

A	Absorbance
AC	Anti- corps
Ac.Et	Extrait d'acétate d'éthyle
ADA	American Diabetes Association
AlCl₃	Chlorure d'aluminium
BuOH	Extrait butanolique
CMV	Infection à cytomégalovirus
CP	Composés phénoliques
DID	Diabète insulino-dépendant
DNID	Diabète non insulino-dépendant
DNS	Acide 3,5-dinitrosalicylique
DPP4	Dipeptidyl peptidase-4
EDIG	équivalents en la digitonine
EQ	équivalents en quercétine
EtOH	Ethanol
GAE	The <i>Gallic Acid</i> Equivalence (l'équivalent acide gallique)
H	Hormones
I%	Pourcentage d'inhibition
IC₅₀	Concentration de substrat qui inhibe 50%
LADA	Latent Auto-immune Diabetes [With onset] in Adults
Na₂CO₃	Carbonate de sodium
Na₂SO₄	Sulfate de sodium
OSM	Organisation mondiale de la Santé
PI%	Pourcentage d'inhibition
Pnd	Pendant
R²	Le coefficient de corrélation
Sap	Saponine
UV	Ultra- violet
V/V	Volume/ volume

Table des matières

Introduction Générale	1
<i>Chapitre I : Aperçu bibliographique</i>	
I. 1. Les plantes médicinales	4
I. 2. Les métabolites secondaires des plantes	5
I. 2.1. Les composés phénoliques	5
I. 2.2. Les flavonoïdes	5
I. 2. 3. Les Saponines	6
I. 3. Le diabète	6
I. 3.1. Définition	6
I. 3 .2. Classification	6
A. Diabète de type I	7
B. Diabète de type II	7
C. Autres formes de diabète	7
I. 3 .3. Glycorégulation	7
a) Organes impliqués	7
b) Hormones impliqués	7
I. 3 .4. Traitement du diabète	7
a. Traitement du diabète de type I	7
b. Traitement du diabète de type II	7

I.3. 5. Nouvelle alternative de traitement	8
I. 3. 6. Inhibition de l'α – amylase	8
A. Définition d'un enzyme	8
B. Définition d'α - amylase	8
 <i>Chapitre II : Partie expérimentale</i> 	
I. 1. Matériel végétal	12
II. 2. Préparation des extraits	14
II. 2. 1. Prétraitement des échantillons	14
II. 2.2.Extraction des composés phénoliques	14
A. Macération	14
B. Dépigmentation	14
C. Purification	15
II.2.3. Extraction des saponines	15
A. Macération	15
B. Dépigmentation	15
C. Purification	15
II.3. Analyses chimiques	16
II.3.1. Quantification des phénols totaux	16
A. Principe	16
B. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	16
C. Mise en œuvre du dosage	17

II.3.2. Quantification des flavonoïdes	17
A. Principe	17
B. Courbe d'étalonnage de la quercétine	18
C. Mise en œuvre du dosage	18
II.3.3. Quantification des saponines	19
A. Principe	19
B. Courbe d'étalonnage de la digitonine	19
C. Mise en œuvre du dosage	20
II.4. Evaluation de l'activité inhibitrice sur l'α – amylase	20
A. Principe	20
B. Procédure expérimentale	21

Chapitre II : Résultats et discussion

III. 1. Extractions des composés phénoliques	24
III. 1. 2. Dosage des composés phénoliques et flavonoïdes	25
III. 2. Extractions des Saponines	29
III. 2.1. Dosage des Saponines	32
III. 3. Effet inhibiteur des différents extraits des deux plantes sur l'α-amylase	34
III. 3.1. Etude du pouvoir anti-amylasique	36

Conclusion générale	40
Références bibliographiques	43
Annexe	56

Liste des figures

Figure I.1.	Diagramme en ruban de structure de l' α -amylase humain présente les trois domaines.	9
Figure II.1.	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	17
Figure II.2.	Courbe d'étalonnage de quercétine	18
Figure II.3.	Courbe d'étalonnage de la digitonine	20
Figure II.4.	La réaction du réactif DNS avec un sucre réducteur	21
Figure III.1.	Photos illustrant les extraits d'acétate d'éthyle obtenus à partir des deux plantes (<i>Cupressus sempervirens L</i> et <i>Achillea santolina</i>)	24
Figure III.2.	Comparaison entre les teneurs en phénols totaux et les teneurs en flavonoïdes des différentes fractions issues de l'extraction (acétone/eau) et (éthanol / eau) des plantes étudiées.	27
Figure III.3.	Photos illustrant les extraits obtenus à partir de l'extraction de fraction d'Act .ET	30
Figure III.4.	Photos illustrant les extraits obtenus à partir de l'extraction de fraction N-but.	30
Figure III.5.	Rendements par macération (éthanol / eau)	31
Figure III.6.	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'Ac.Et, et de N-butanol issus d'une extraction (éthanol/eau) partie les cônes de la plante <i>Cupressus sempervirens</i>	36
Figure III.7.	Histogrammes représentant les valeurs d'Ic50 d'extraits Act-Et et N-but descônes par l'extraction (Ethanol/eau)	37

Annexe 01.	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'A c. Et issus d'une extraction (acétone/eau) de les graines et les cônes (Cupressus) et l'Achillea	59
Annexe 02.	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'une extraction (éthanol/eau) des graines (Cupressus) et l'Achillea	60

Liste des Tableaux

Tableau II.1.	Nom, photo, utilisation et parties utilisées des plantes investiguée	13
Tableau III.1.	Teneurs, aspects et couleurs des extraits d'Ac .ET dans les deux plantes étudiés	24
Tableau III.2.	Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des deux plantes étudiées	26
Tableau III.3.	Teneurs, aspects et couleurs des extraits hydro-alcooliques (Ethanol/eau)	29
Tableau III.4.	Teneur en saponines de différents extraits dans les plantes étudiés.	32
Tableau III.5.	Taux d'inhibition des extraits phénoliques des plantes étudiées vis-à-vis L' α -amylase.	34
Tableau III.6.	Valeurs des IC50 des extraits Act Et et N-but (éthanol/eau) pour les cônes de <i>Cupressus sempervirens L</i> vis-à-vis de l' α -amylase	37

Introduction Générale

Dans les dernières décennies, il ya eu un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et leurs utilisation traditionnelle dans différentes régions du monde (**Muthus** et al., 2006).

Les composés naturels issus des végétaux présentent une très grande diversité de structures chimiques et un très large éventail d'activités biologiques (**Bérubé-Gagnon.**, 2006). Ces substances naturelles ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : alimentaire, cosmétologique et dermo-pharmaceutique (**Djeridane et al.**, 2006).

Parmi ces composés, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve toujours chez les plantes des molécules actives nouvelles (**Bhorun.**, 1997), parmi les constituants bioactifs les plus importants ,on note les composés phénoliques, les saponines, les alcaloïdes et les huiles essentiels qui ont fait l'objet de nombreuses études pour leurs activités biologiques (antioxydants , inhibiteurs d'enzymes, antimicrobiens...) (**Leland et al.**,2006 ; **Da Silva et al.**,2013 ; **Joseph et Jini.**,2013).

Le diabète est une des maladies être soumis sous étude, plus de 800 plantes sont utilisées en médecine traditionnelle comme additifs contribuant à l'effet hypoglycémiant (**Allali et al.**, 2008 ;**Azzi et al.**,2012).

Nombreuses études ont prouvé l'effet inhibiteur sur l'enzyme clé de la digestion des glucides : l' α amylase par des composés phénoliques, et des saponines, en formant de liaisons hydrogènes entre ses groupements hydroxyles et les résidus du site actif de l'enzyme (**Sales et al.**, 2012 ; **Yousefi et al.**,2006).

Le présent travail entre dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et spontanées de la région de Laghouat, en s'intéressant à deux espèces locales «*Cupressus sempervirens L*» et «*Achillea santolina*».

Nous avons évalué leur activité inhibitrice sur l' α amylase, dont l'inhibition prolonge l'hydrolyse des hydrates de carbones, réduisant ainsi le taux d'absorption du glucose afin d'éviter la monté de son taux plasmatique.

Notre travail est réalisé selon les étapes suivantes :

- La première partie est consacrée à un aperçu bibliographique sur l' α amylase, et le diabète.
- La deuxième partie est réservée à la description du Protocole expérimental.
- L'interprétation et la discussion des résultats seront présentés dans la dernière partie.

Chapitre I

Aperçu bibliographique

I. 1. Les plantes médicinales

Une plante médicinale est une plante que l'on cultive ou que l'on recueille dans son milieu naturel pour ses propriétés médicinales (**Delaveau P.**, 1978). L'être humain, a utilisé les plantes depuis des milliers d'années pour traiter divers maux, le monde végétale est à l'origine d'un grand nombre de médicaments.

Récemment, les chercheurs ont estimé qu'il existe environ 400 000 espèces de plantes dans le monde, dont environ le quart ou le tiers sont utilisées par les différentes sociétés pour des fins médicinales (**Malon.**, 1991).

Par ailleurs, selon l'OMS, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui constituent 90% de la médecine traditionnelle.

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'Homme et des différents écosystèmes. Celles-ci renferment une part importante de composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques et/ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme.

On distingue ainsi deux groupes de métabolites ; les métabolites primaires et les métabolites secondaires (**Hartmann T.**, 2007).

- **Les métabolites primaires** : sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes à savoir, les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques (**Donatien.**, 2008).

- **Les métabolites secondaires** : sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à sa survie. Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique (**Donatien.**, 2008).

I. 2. Les métabolites secondaires des plantes

Une des originalités majeures des végétaux réside dans la capacité à produire des substances naturelles très diversifiées, ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires comme, les composés phénoliques (**Macheix et al.**, 2005).

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés tels que les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques...etc. (**Marouf.**, 2000). Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés antioxydantes, anti microbiennes, anti-inflammatoires, anti carcinogènes ou mutagènes (**Epifano et al.**, 2007).

I. 2.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, improprement appelés souvent les polyphénols (**Ollivier et al.**, 2001), Sont des métabolites secondaires ayant comme base un cycle benzoïque portant un ou plusieurs groupements hydroxyle (OH). À cette base peut s'ajouter plusieurs cycles benzoïques et divers groupements comme des méthyles, des méthoxys, des amines et des glycosyles (**Guidi et al.**, 2005). Les deux principaux groupes de composés phénoliques sont les flavonoïdes et les acides phénoliques (les acides hydroxy benzoïques et hydroxycinnamiques). (**Dixon et Paiva.**, 1995).

La présence d'un ou plusieurs cycles benzoïques hydroxylés, est responsable de certaines propriétés communs utilisées pour les extraire à partir de la matière végétale, les caractériser chimiquement et les doser.

I. 2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone à 15 atomes de carbone (C₆- C₃-C₆), constitué de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C, portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (**Dacosta**, 2003).

Les flavonoïdes sont souvent des molécules de défense contre les organismes pathogènes, il n'est donc pas surprenant que certains de ces composés possèdent un potentiel en thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, virus, champignons), contre les parasites et les insectes. Leur capacité antioxydante peut aussi expliquer un certain nombre de propriétés thérapeutiques. Les isoflavonoïdes, en tant que phytoestrogènes, possèdent de nombreuses activités biologiques (**Sylvie MOREL**, 2011).

I. 2. 3. Les Saponines

Les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine, saponine stéroïdique et saponine triterpénique. (**Hostettman et Marston, 1995**), attribuent aux hétérosides d'amines stéroïdiques (solasolènes et solanidanes) le rang de troisième groupe dans la famille des saponines.

Cependant d'autres auteurs distinguent ce groupe comme des alcaloïdes. Certes, ce ne sont bio génétiquement que des pseudo-alcaloïdes et, en termes de propriétés, leur comportement n'est pas sans rappeler celui des saponosides. Il n'en demeure pas moins que l'origine de leur atome d'azote les rapproche d'autres dérivés azotés du métabolisme terpénique que l'on s'accorde à considérer comme des alcaloïdes (ex. : aconitine) (**Bruneton, 2009**).

Les saponines présentent des activités biologiques et pharmacologiques variées, principalement dans les domaines de l'immunologie, la cancérologie et la microbiologie (**Lacaille-Dubois et Wagner, 2000 ; Lacaille-Dubois, 2005**). Les saponines sont connues pour leurs activités anti-tumorales (**Sautour et al., 2007 ; Podolak et al., 2010**), anti-inflammatoires (**Adão et al., 2011**) immunostimulants et immun adjuvants, antimicrobiennes (**Vermeersch et al., 2009**).

I. 3. Le diabète

I. 3.1. Définition

Le diabète est une maladie chronique, caractérisée par une altération du métabolisme de glucose et des autres substrats énergétiques, et par le développement tardif de complications vasculaires et neurologiques (**Rodier, 2001 ; LADA, 2008**).

Indépendamment de la cause, la maladie est associée à un déficit en insuline, qui peut être total partiel ou relatif dans le contexte d'une insulino - résistance associée. La carence en insuline joue un rôle principal dans les désordres métaboliques liés au diabète et l'hyperglycémie (**Claude, 1997**).

I. 3.2. Classification

La classification ancienne prenait en compte le mode de traitement de la maladie : le diabète insulino - dépendant (DID), et le diabète non insulino – dépendant (DNID).

La classification actuelle, selon l'éthiologie (**OMS et ADA : American Diabetes Association, 1997**).

A. Diabète de type I : consiste à une destruction des cellules β conduisant à un déficit total en insuline

Forme particulière : LADA (Latent Auto-immune Diabetes [With onset] in Adults) : diabète de type I avec manifestation à l'âge adulte (>25 ans), la carence en insuline se développe relativement lentement ; pas d'obligation d'insuline dans les 6 premiers mois, mise en évidence des Ac GAD

B. Diabète de type II :

Il y a à la base 3 facteurs, d'importance relative variable : une résistance insulinique, une déficience sécrétrice des cellules B ainsi qu'une apoptose avancée des cellules B.

C. Autres formes de diabète :

Défaut génétique dans la fonction de la cellule B (hérédité autosomique dominante) Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY [E11.90]) sans mise en évidence d'auto-Ac et sans obésité : manifestation avant l'âge de 25 ans ; environ 1% de tous les diabétiques.

I. 3.3. Glycorégulation

a) Organes impliqués :

- Pancréas.
- Foie, muscles, tissus adipeux.

b) Hormones impliqués :

- Insuline unique : H hypoglycémiant.
- Glucagon : principale H hyperglycémiant, agit selon l'état physiologique.
- Cortisol, GH, Catécholamines, H thyroïde, agissent si stress intense, activité physique intense ou en pathologie.

I. 3.4. Traitement du diabète

a. Traitement du diabète de type I

Administration d'insuline, régime, activité physique (**Herold**, 2012 ; **Gérard**, 2005)

b. Traitement du diabète de type II

Régime diabétique, activité physique, administration d'antidiabétique oral (**AFSSPS**, 1999).

I. 3. 5. Nouvelle alternative de traitement

Les hypoglycémiantes de synthèse, sont susceptibles de causer beaucoup d'effets secondaires, de ce fait pour pallier aux effets secondaires des traitements antidiabétiques, les recherches scientifiques se sont tournées vers les plantes en raison de leur disponibilité, leur faible coût et leur moindre effet secondaires. Les différentes enquêtes ethnobotaniques réalisées à travers le monde, ont montré que plus de 800 plantes sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète sucré et ses complications, dont 410 espèces ont prouvé expérimentalement leur effet antidiabétique (**Bedekar** et *al.*, 2010 ; **Perla** et **Jayanty**, 2013).

Les principaux phyto-constituants actifs isolés de plantes antidiabétiques sont généralement des métabolites secondaires, représentés essentiellement par les polyphénols, les alcaloïdes, les saponines, les coumarines et les terpénoïdes (**Hanhineva** et *al.*, 2010).

Les polyphénols représentés majoritairement par les flavonoïdes, les tannins, les acides phénoliques et stilbènes, lignines suscitent un grand intérêt scientifique actuellement car ils sont considérés comme de puissant antioxydant, anti-inflammatoire, antidiabétique et anticancéreux (**Hanhineva** et *al.*, 2010).

I. 3. 6. Inhibition de l' α - amylase

A. Définition d'un enzyme

Les enzymes sont des protéines douées d'une activité biologique particulière : la capacité à catalyser des réactions biologiques. Les catalyseurs sont des outils qui permettent de très fortement accélérer la vitesse de ces réactions. Ils agissent à faible concentration et sont régénérés en fin de la réaction. (**Athel** et *al.*, 2005).

B. Définition d' α - amylase

L' α - amylase (1,4- α -D-glucosyl-hydrolase, E.C.3.2.1.1) est une enzyme comportant une chaîne polypeptidique de 496 acides aminés, est une enzyme monomérique, de poids moléculaire variant entre 41 et 78 k Da distribués alternativement en formant des sections hydrophobes et hydrophiles (**Banner** et *al.*, 1975). Elle est répandue dans tous les organismes vivants. Dans les systèmes digestifs des humains et beaucoup d'autres mammifères, elle est aussi appelée « diastase » (**Payen** et **Persoz**, 1833).

La structure tridimensionnelle de l'alpha amylase montre trois domaines A, B, C dont le domaine A représenté le site actif de l'enzyme et le B désigne le site de liaison du calcium, tandis que la fonction du domaine C est inconnu (**PDB**, 2006).

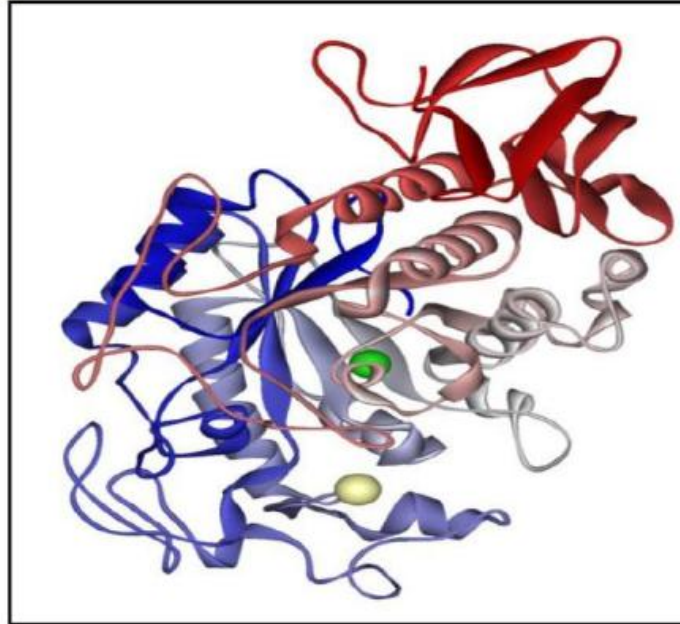


Figure I. 1. Diagramme en ruban de structure de l' α -amylase humaine présente les trois domaines (rose et gris: domaine A; bleu le domaine B, rouge domaine C) avec l'ion chlorure (vert) et l'ion calcium (jaune). (**PDB**,2006).

L' α amylase est une enzyme glycolytique secrétée par la glande pancréatique à travers le suc pancréatique dans l'intestin, c'est l'enzyme clé qui catalyse la première étape du processus digestif des hydrates de carbone (glucides). Elles sont très importantes, tant par leurs applications industrielles et biotechnologiques (biodégradation ou transformation de l'amidon, par exemple) que par leur implication dans certains troubles métaboliques (diabète, obésité, etc.) (**Banner et al.**, 1975).

D'où, les inhibiteurs de l'hydrolyse des hydrates de carbone par l' α -amylase dans le tractus digestif retardent leur digestion et prolonge son temps, causant une réduction dans le taux d'absorption du glucose, et par conséquent diminution des niveaux de glucose plasmatique et abaissement de l'hyperglycémie (**Raj Bhandari et al.**, 2008 ; **Worsztynowicz et al.**, 2014).

L'acarbose, le miglitol sont utilisés pour le traitement comme inhibiteur de compétitif des gluco-amylases, saccharases et maltase de la muqueuse grêle (**Herold**, 2012).

Nombreux auteurs se sont intéressés aux plantes médicinales ayant un effet inhibiteur vis-à-vis de l' α -amylase. **Ramírez** et *al.*, 2012 ont examiné l'effet inhibiteur des extraits hydro-éthanolique de 23 plantes médicinales utilisées au Mexique comme antidiabétiques sur l' α glucosidase obtenue à partir de la muqueuse intestinale de rat ; Les résultats montrent que les composés majoritaires (cathéchines, flavonoles, flavones, des dérivés de cafeoyl) des plants présentent une activité inhibitrice plus élevée.

Chapitre II



Partie expérimentale

II. 1. Matériel végétal

Notre étude, a été réalisée sur deux espèces végétales spontanés locales à savoir *Cupressus sempervirens L* et *Achillea santolina*.

Les deux échantillons ont été récoltés aux alentours du chef-lieu de la wilaya de Laghouat, durant le mois de Juin 2016 dans des endroits propres et loin de toute influence de pollution. Les noms des plantes, leur photos, leur utilisation ainsi que les parties utilisées de chaque'une d'elles sont résumées dans le **Tableau II.1**.

Tableau II.1. Nom, photo, utilisation et parties utilisées des plantes investiguées.

Nom de la Plante	Utilisation	Photo	Partie utilisée
<p>Famille Cupressaceae Genre <i>Cupressus</i> Nom binominal <i>Cupressus sempervirens</i> <i>L</i> Nom vernaculaire السرو Nom français cyprès</p>	<p>Les cônes de cyprès renferment des flavonoïdes aux propriétés anti inflammatoires, et des leuco anthocyanes qui protègent le système vasculaire et maintiennent le tonus veineux.</p> <p>Il est ainsi indiqué pour soigner les pathologies telles que les hémorroïdes, les varices, les jambes lourdes et douloureuses, les œdèmes des membres inférieurs</p>		<p>Les Cônes et les Graines</p>
<p>Famille Asteraceae Genre <i>Achillea</i> Nom binominal <i>Achillea santolina</i> Nom vernaculaire القبصوم الفواح Nom français les achillées</p>	<p><i>Achillea Santolina</i>, une plante traditionnellement utilisée en Irak, en Egypte et au Pakistan comme antidiabétique, anti-inflammatoire et pour soulager la douleur.</p> <p>Aussi comme tonique, vermifuge et carminatif, ainsi que pour les douleurs à l'estomac et l'hypertension, contient plusieurs polyphénols, une famille de composés avec un grand potentiel antidiabétique.</p>		<p>Partie aérienne</p>

Source : Waston et al ; 2013, MARCELLO et al.2004 ; CAMUS A., 1914 et sante-médecine ;2016
Tela- botanica.org et Najim Abbas ;2013

II.2. Préparation des extraits

II. 2. 1. Prétraitement des échantillons

Après la récolte, les cônes, les graines des cyprès, et les feuilles d'Achillea ont été séchés à température ambiante, à l'abri de la lumière et dans un endroit sec et bien aéré. Par la suite, ils ont été broyés dans un moulin électrique et tamisés en vue d'obtenir la même granulométrie, et conservés jusqu'à extraction.

II. 2. 2 . Extraction des composés phénoliques

A. Macération

Des quantités de 10 g des poudres précédemment obtenues ont été macérées dans 50 ml d'un mélange (Acétone/eau) (70/30 : v/v) pendant 24 heures à température ambiante et à l'obscurité. Les extraits ont été filtrés puis les résidus ont été macérés pour une deuxième fois dans les mêmes conditions. Ce qui permet d'obtenir d'extraits bruts (**Gilani et al.**, 2001) modifié par (**Boudiaf.**, 2006).

B. Dépigmentation

Les extraits bruts ont été évaporés sous pression réduite à 45°C, puis les phases aqueuses restantes ont été lavées quatre fois avec un même volume d'hexane, jusqu'à l'épuisement des pigments.

C. Purification

Les phases aqueuses ainsi obtenues sont ensuite lavées dans des ampoules à décanter trois fois avec un même volume l'acétate d'éthyle jusqu'à l'épuisement (**Merghem et al.**, 1995, **Djeridane et al.**, 2005). Ce qui nous a permis d'avoir les fractions acétate d'éthyle contenant des composés phénoliques polaires.

Les extraits organiques ainsi obtenus ont été séchés avec du sodium anhydre puis évaporés à sec sous pression réduite à 45°C. Les résidus secs sont repris dans 10 ml de méthanol pur donnant les fractions phénoliques correctement purifiées et conservées au réfrigérateur jusqu'à leur analyse.

II.2.3. Extraction des saponines

L'extraction a été réalisée selon trois étapes : macération, dépigmentation et purification.

A. Macération

Des quantités de 10 g des poudres précédemment obtenues ont été macérées dans 50 ml d'un mélange hydro-alcoolique (éthanol/eau) (70/30 : V/V) pendant 24 heures à température ambiante et à l'obscurité. Les extraits ont été filtrés puis les résidus sont repris pour une deuxième macération dans les mêmes conditions. Ce qui donne des extraits hydro-alcooliques bruts.

B. Dépigmentation

Les extraits bruts sont évaporés sous pression réduite à 45°C, puis les phases aqueuses restantes ont été lavées quatre fois avec un même volume d'hexane jusqu'à l'épuisement des pigments.

C. Purification

Les phases aqueuses obtenues sont ensuite lavées dans des ampoules à décanter trois fois avec un même volume d'acétate d'éthyle jusqu'à épuisement, suivi d'un lavage avec le butanol saturé en eau jusqu'à épuisement, ce qui nous a permis d'avoir les fractions butanol contenant les saponines.

Les extraits butanoliques obtenus sont séchés avec du sodium anhydre puis évaporés à sec à pression réduite à 45°C. Les résidus secs sont repris dans 10 ml de méthanol pur donnant les fractions saponines correctement purifiées et conservées au réfrigérateur jusqu'à leur analyse.

II.3. Analyses chimiques

II.3.1. Quantification des phénols totaux

A. Principe

La teneur en phénols totaux des extraits des plantes qui ont fait l'objet de notre analyse a été déterminée par la méthode de (**Singleton et Rossi.**, 1965 ; **Kim et al.**, 2002 ; **Djeridane et al.**, 2006), utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu qui s'avère la plus sensible.

La teneur en phénols totaux est habituellement déterminée par spectrophotométrie UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du mélange d'acide phosphotungestique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀), lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite, dont l'absorption maximum est à 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans nos extraits (**Ribéreau-Gayon.**, 1968 ; **Nathalie et al.**, 2006).

Pour quantifier les phénols totaux dans nos extraits, une courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été réalisée.

B. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

A partir d'une solution étalon d'acide gallique, une gamme de solutions diluées a été préparée.

A l'aide d'une micropipette, 100 µl de chaque solution est introduite dans des tubes à essais, suivi de l'addition de 500 µl du réactif de Folin-Denis, après 2 minutes d'incubation, 2 ml de carbonate de sodium ont été ajoutés. Les tubes sont ensuite incubés pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de type Shimadzu 1601 à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc ce qui nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

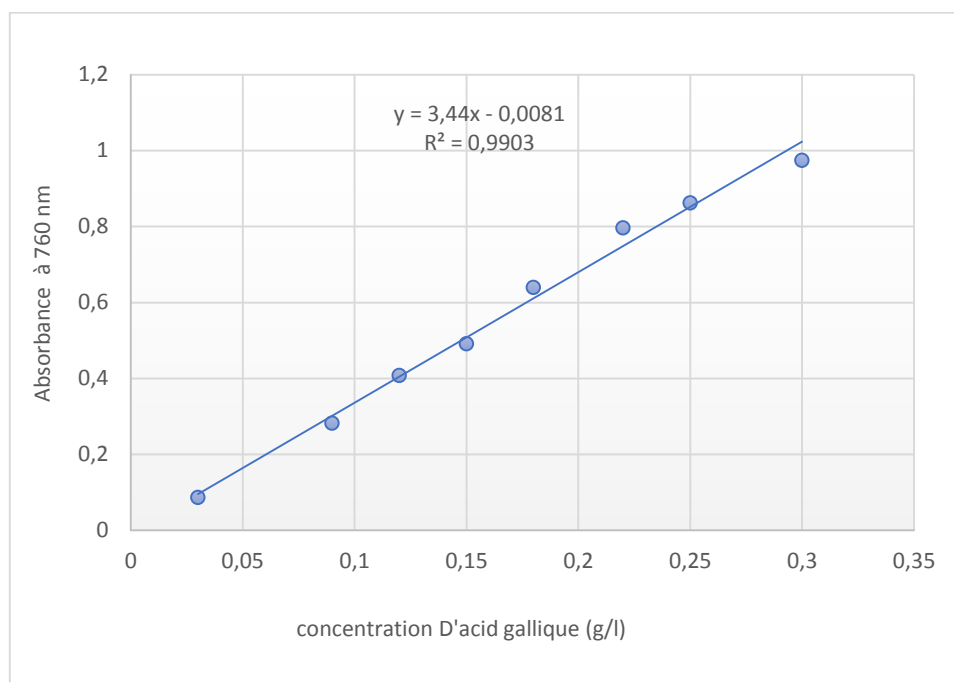


Figure II.1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

C. Mise en œuvre du dosage

Pour la quantification de phénols totaux dans nos extraits, nous avons suivi la même procédure décrite précédemment, en effectuant des dilutions pour obtenir des absorbances comprise entre 0,0 et 0,9.

II.3.2. Quantification des flavonoïdes

A. Principe

Les teneurs en flavonoïdes ont été mesurées par une méthode adaptée de (**Lamaison et Carnat**, 1991 et **Bahorun et al.**, 1996), en utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) comme réactif qui 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 (**Donzo et al.**, 2015).

Afin de quantifier les teneurs en flavonoïdes dans nos extraits, une courbe d'étalonnage d'un flavonoïde étalon : la quercétine a été tracée.

B. Courbe d'étalonnage de la quercétine

À partir d'une solution méthanolique de quercétine, une gamme de solutions diluées a été préparée en milieu organique.

1 ml du trichlorure d'aluminium 2 % est additionné à 1 ml de chaque dilution. Les milieux réactionnels sont ensuite incubés pendant 20 min dans l'obscurité et 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. Les valeurs de l'absorbance ainsi obtenues nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de la quercétine.

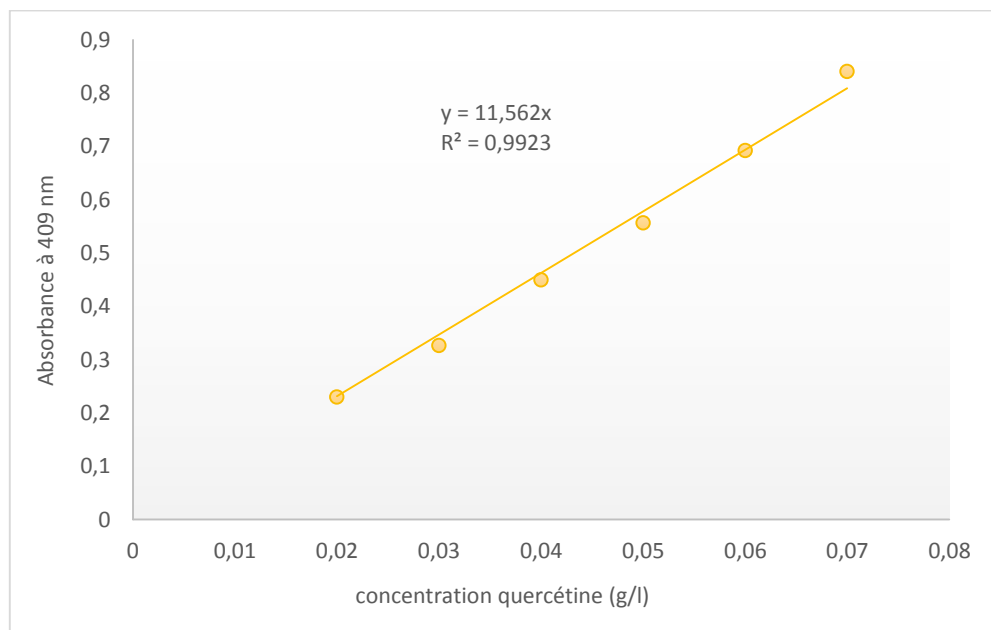


Figure II.2. Courbe d'étalonnage de quercétine

D. Mise en œuvre du dosage

Pour la quantification des flavonoïdes dans nos extraits, nous avons suivi la même procédure décrite précédemment, en effectuant des dilutions pour obtenir des absorbances comprise entre 0,0 et 0,9.

II.3.3. Quantification des saponines

A. Principe

L'évaluation quantitative des saponines dans les différentes fractions est réalisée selon la méthode de (**Hiai et al.**, 1976) avec des modifications en utilisant la vanilline comme réactif.

La vanilline est un aldéhyde aromatique qui se lie avec les groupements de méthylènes insaturés des saponines libérés après la déshydratation dans un milieu acide (acide sulfurique concentré) et en présence de la chaleur formant un complexe chromogène rouge mauve qui absorbe à une longueur d'onde de 544nm (**Hostettmann et Marston**, 1995).

B. Courbe d'étalonnage de la digitonine

À partir d'une solution méthanolique de digitonine, une gamme de solutions diluées a été préparée.

A 250µL de chaque solution diluée est additionné 250 µl de vanilline (8 %), et 2,5 ml d'acide sulfurique 72%. Les milieux réactionnels sont ensuite incubés au bain marie à 60 °C pendant 10 min. à leur sortie du bain, les tubes sont refroidis dans l'eau de robinet. La lecture de l'absorbance de chaque solution préparée a été mesurée dans le même spectrophotomètre à une longueur d'onde de 544 nm contre un blanc. Les valeurs de l'absorbance ainsi obtenues nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de la digitonine.

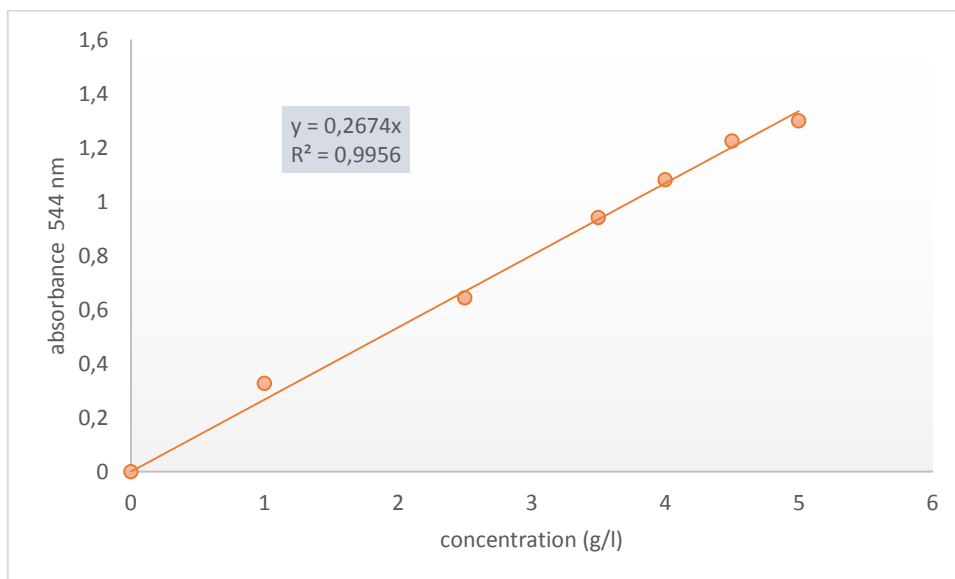


Figure II. 3. Courbe d'étalonnage de de la digitonine

C. Mise en œuvre du dosage

Pour la quantification des saponines dans nos extraits, nous avons suivi la même procédure décrite précédemment, en effectuant des dilutions pour obtenir des absorbances comprise entre 0,0 et 0,9.

II.4. Evaluation de l'activité inhibitrice sur l' α – amylase

Dans la présence étude, on s'intéresse à l'évaluation de l'effet des composés phénoliques et des saponines des plantes investiguées sur l'activité enzymatique de l' α amylase. Dans le cas de cette enzyme la mesure de l'activité enzymatique revient à un dosage spectrophotométrique indirect du produit libéré par unité de temps lors de l'hydrolyse du substrat, dans des conditions de température et de pH favorable.

A. Principe

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 hydrolyse ce substrat pour libérer le maltose et d'autres produits. Le maltose libéré est dosé spectrophotométriquement.

L'activité de l' α - amylase est mesurée selon la méthode de (Benfeld, 1955), le principe de cette méthode repose sur le dosage des groupements aldéhydes et cétones libre des sucres réducteurs libérés lors de l'hydrolyse de l'amidon par l' α - amylase.

En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation de ces fonctions provoque simultanément la réduction l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) de couleur jaune orange en acide 3- amino-5 nitrosalicylique de couleur rouge orange qui absorbe à 540 nm (Miller, 1956).

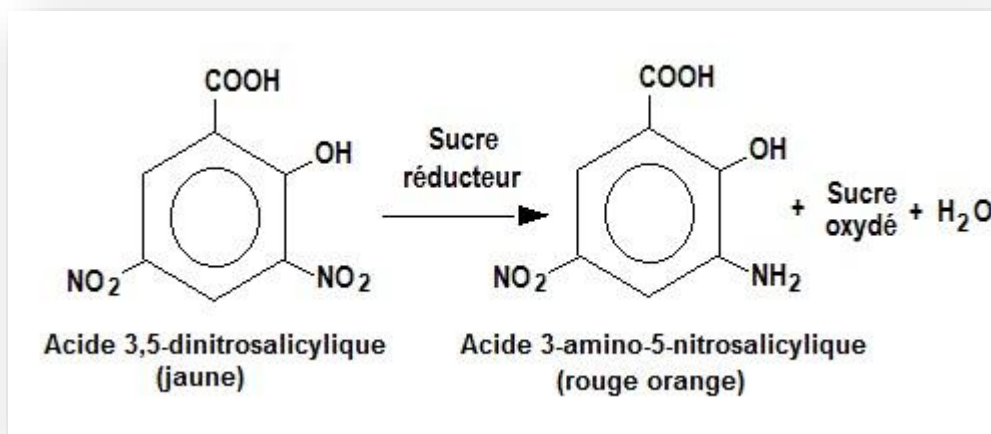


Figure II.4. La réaction du réactif DNS avec un sucre réducteur (Castellucci, 2013)

B. Procédure expérimentale

Avant de procéder à l'étude de l'activité inhibitrice de nos extraits vis à vis de l' α - amylase, nous les avons soumis des tests d'inhibition question de juger leur potentiel inhibiteur envers l' α - amylase, c'est-à-dire l'étude de leur comportement sur l'activité enzymatique (augmentation ou diminution) et quel pourcentage d'inhibition ils pouvaient attendre

Dans des tubes à essai les milieux réactionnels contenaient 100 μ l d'un tampon phosphate salé (pH 6,9), 100 μ l d'extrait et 1ml d'amidon, le tout est incubés pendant 5 min à 37 C°, ensuite 100 μ l d'enzyme (0,037g /l) ont été ajoutés.

Le mélange est placé dans un bain marie à 37 °C pendant 10 min, puis la réaction enzymatique est stoppée par l'ajout d'1 ml de DNS, les tubes sont agités et placés

immédiatement dans un bain marie porté à ébullition. Après 5 minutes de chauffage, les tubes sont sortis du bain marie et refroidis à l'eau de robinet puis dilué avec de l'eau distillée.

Les mesures de la densité optique de chaque solution préparée ont été effectuées à 540 nm contre un blanc dans le même spectrophotomètre utilisé précédemment (**Megh Raj Bhandari et al.**, 2008)

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

$$\text{Le pourcentage d'inhibition I\%} = \frac{\text{Absorbance du contrôle} - \text{Absorbance de l'extrait}}{\text{absorbance de contrôle}}$$

Chapitre III

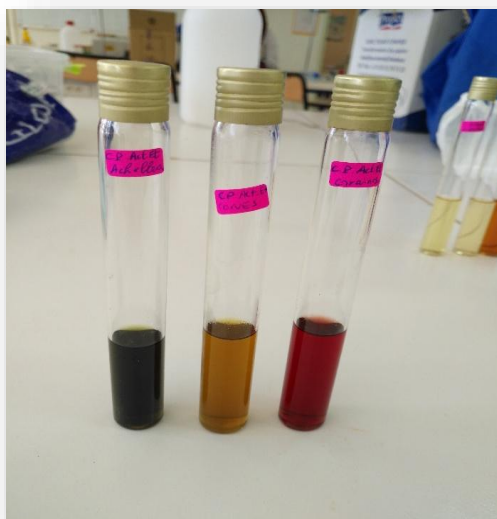
Résultats et discussion

III. 1. Extractions des composés phénoliques

Les rendements des extraits (acétone/eau : 7 /3), leurs couleurs et aspects sont consignés dans le (Tableau III.1).

Tableau III.1. Teneurs, aspects et couleurs des extraits d'acétate d'éthyle dans les deux plantes étudiés

Les plantes	Fraction organique	Couleur et aspects	La masse en (g)	Le rendement en (%)
Cyprés Les cônes	Ac.Et Acétone/eau	Marron visqueux	0 ,338	3,38
Cyprés Les graines	Ac.Et Acétone/eau	Grenat visqueux	0 ,186	1,86
Achillées	Ac.Et Acétone/eau	Vert foncée visqueux	0,191	1,91



Source : Maamri, Bendahghane., 2017

Figure III.1. Photos illustrant les extraits d'acétate d'éthyle issus de système acétone /eau des deux plantes (*Cupressus sempervirens L* et *Achillea santolina*)

Tous les extraits ont montré différentes couleurs qui sont fonction de leur composition, les aspects des extraits sont tous visqueux.

Selon (**Markham.**, 1982) la séparation des composés d'un extrait brut dépend de leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction et donc selon leur degré de glycosilation. Au cours de l'extraction, les solvants se diffusent dans le matériel végétal solide et solubilisent les composés à polarité similaire. Ces produits contiennent un mélange complexe de plusieurs métabolites de la plante, telles que les alcaloïdes, les glycosides, les terpènes, les flavonoïdes et les lignanes (**Tiwari et al.**, 2011).

L'acétone est le solvant le plus approprié pour l'extraction des composés phénoliques totaux (**Digrak et al.**, 2002). Ce solvant, qui est le plus communément utilisé dans l'extraction à la fois des composés de faible et de haut poids moléculaires (**Sandberg et Corrigan.**, 2004).

D'après les résultats du **Tableau III.1**, Les rendements des extraits varient de 1,86 à 3,38 % dans les différentes fractions étudiées. La teneur la plus élevée est enregistrée dans les cônes de la plante *Cupressus sempervirens L.* La plante Achillées (partie aérienne), et les cyprès (graines) n'ont pas atteint 2%.

Ces faibles valeurs sont influencées par plusieurs paramètres qui sont : la partie de plante utilisée comme matériau de départ, le solvant utilisé pour l'extraction, la procédure de l'extraction (agitation ou non) et la température utilisée (**Tiwari et al.**, 2011 ; **Escribano et Santos.**, 2003).

Selon (**Meziti.**, 2009), le développement d'un extrait à la température ambiante permet d'obtenir un maximum de composés et de prévenir aussi leurs dénaturations et/ou modifications probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

III. 1. 2. Dosage des composés phénoliques et flavonoïdes

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait de plante a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique précédemment réalisée (**Figure II.1**) et exprimée en milligrammes équivalents en acide gallique par gramme de matière sèche.

À partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine (**Figure II.2**), nous avons déterminé la quantité des flavonoïdes présents dans les extraits en équivalent de la quercétine. Les résultats sont résumés dans le (**Tableau III.2**).

Tableau III.2. Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des deux plantes étudiées

Partie de la plante	Fraction	Teneurs en Phénols totaux « mg EAG/g MS»	Teneurs en flavonoïdes « mg EQ/g MS»
<i>Cupressus</i> (Les Cônes)	Act Et (Acétone/eau)	1,96	0,011
	Act Et (EtOH/eau)	2,07	0,084
	N-but (EtOH/eau)	0,081	0,036
<i>Cupressus</i> (Les Graines)	Act Et (Acétone/eau)	2,25	0,018
	Act Et (EtOH/eau)	2,59	0,77
	N-but (EtOH/eau)	0,46	0,11
<i>Achillea</i>	Act Et (Acétone/eau)	2,21	0,020

Dans le tableau ci-dessus, nous constatons que les quantités en polyphénols et le dosage des flavonoïdes varient d'un extrait à un autre suivant les conditions et les solvants utilisés.

Le dosage des composés phénoliques dans les extraits des 2 plantes étudiées a donné des teneurs qui varient de la plus petite valeur : 0,081 mg EAG/g MS de matière sèche dans l'extrait butanolique des cônes dont l'extraction issus de système de solvant (éthanol / eau), à la plus grande valeur : 2,59 mg EAG /g de matière sèche dans l'extrait Act Et des graines de même extraction. L'*Achillea* a enregistré 2,21 mg EAG /g de matière sèche dans l'extrait Ac Et issu de système de solvant (éthanol / eau). Nous pouvons constater que cette plante est moins riche en composés phénolique.

Les Graines et les cônes de la plante *Cupressus sempervirens L* ont enregistré une quantité faible en phénols totaux et flavonoïdes, Comparativement à d'autres travaux sur des plantes médicinales locales déjà étudiées, tel que la *Juniperus oxycedrus* (12.66 ± 0.41 (mg GAE/g d'extrait)) l'*Artemisia herba halba* (13.06 ± 0.40 (mg GAE/g d'extrait)) (Djeridane et al., 2005), nous pouvons déduire, que les extraits de *Cupressus sempervirens L* constituent une faible source en composés phénoliques et flavonoïdes. Selon (Rakotonanahary, 2012), la famille de *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae*, sont riches en huiles essentielles.

En plus, si on compare nos résultats par rapport à d'autre plantes du même genre (Cosentino et al, 2003 ; Angioni et al, 2003 et El-Sawi et al, 2007), tel que les feuilles et les cônes (fruits) de *Juniperus phoenicea*, la majorité des composants chimiques sont des huiles volatiles, Cette espèce ne comprend que de petites quantités de dérivés phénoliques : flavones et Lignanes, (Cairnes et al, 1980 ; Comte et al, 1996). Ces résultats révèlent peut être que les extraits de plante de *Cupressus sempervirens L* investiguée sont pauvres en composés phénoliques.

Dans un souci de simplification, nous donnons les résultats de nos extraits en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes, sous forme d'histogramme mentionné ci-dessous (Figure III.2).

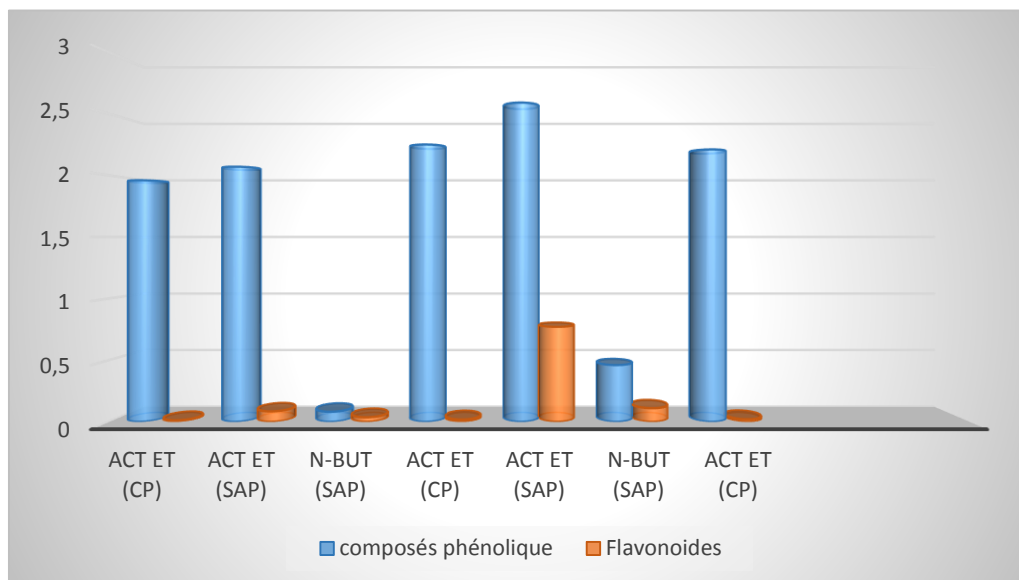


Figure III.2. Comparaison entre les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des différentes fractions issues de l'extraction (acétone/eau) et (éthanol / eau) des plantes étudiées.

Par comparaison, on remarque que les teneurs en flavonoïdes sont nettement inférieures à celle des composés phénolique, ce qui indique que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possédants autres structures chimiques que les flavonoïdes (acide phénolique, tanins, stilbènes, saponines...).

L'espèce *Achillea santolina* a montré sa teneur faible en flavonoïdes aussi, dans l'extrait Act-Et dont l'extraction issus des systèmes de solvant (acétone / eau), dans les deux autres extraits Act-Et et N-but issus de système (éthanol/eau) les résultats ne sont pas significatifs.

Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

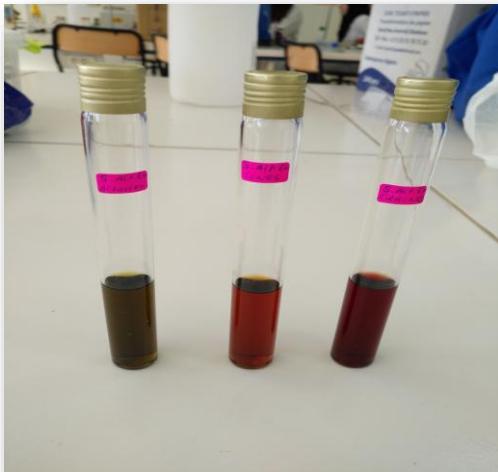
- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies...etc. (**Ebrahimi** et *al.*, 2008).
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (**Miliauskas** et *al.*, 2004).
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (**Lee** et *al.*, 2003).

III. 2. Extractions des Saponines

Les rendements des extraits hydro-alcoolique (Ethanol/eau : 7/3), leurs couleurs et aspects sont consignés dans le (Tableau III.3).

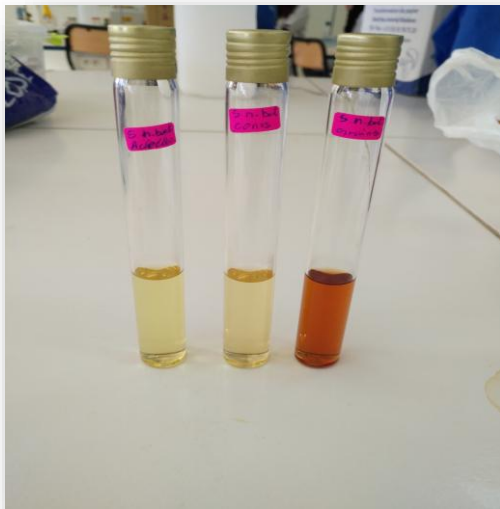
Tableau III.3. Teneurs, aspects et couleurs des extraits hydro-alcooliques (Ethanol/eau).

Fraction organique	Couleur et aspects	La masse en (g)	Le rendement en (%)
Ac.Et Les cônes	Marron foncée visqueux	0,206	2,06
Ac.Et Les graines	Grenat visqueux	0,305	<u>3,05</u>
Ac.Et L'Achillea	Vert foncée visqueux	0,243	2,43
N-but Les cônes	Marron claire	0,021	0,21
N-but Les graines	Marron foncé	0,032	0,32
N-but L'Achillea	Marron claire	0,054	0,54



Source : Maamri, Bendahghane., 2017

Figure III.3 Photos illustrants les extraits d'Act .ET obtenus à partir de l'extraction (éthanol/eau)



Source : Maamri, Bendahghane., 2017

Figure III.4. Photos illustrant les extraits N-but obtenus à partir de l'extraction (éthanol/eau)

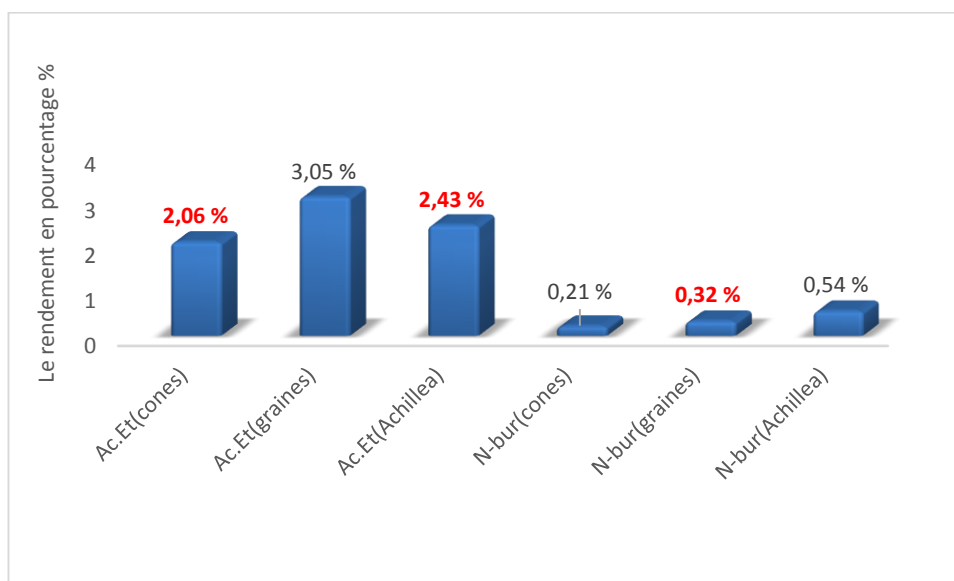


Figure III.5. Rendements des saponines par macération (éthanol / eau).

D'après les résultats de l'extraction liquide-liquide utilisant des solvants à polarité croissante (**Tableau III.3.**), nous pouvons déduire que le rendement le plus élevé a été obtenu dans les extraits d'acétate d'éthyle (les graines) de la plante *Cupressus sempervirens L* (3,05%), puis l' *Achillea santolina* (2,43%) et (les cônes) de la plante *Cupressus sempervirens L* (2,06%).

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction, de la **Figure III.5** que la fraction butanolique est nettement inférieure à celle de la fraction d'acétate d'éthyle dans *Cupressus sempervirens L* et *Achillea santolina*, ceci est dû à la nature et à la structure des molécules présentes dans la plante étudiée comme les composés polaires (tanins, saponines ...) (**Evans.**, 2006).

Par comparaison entre les deux extractions (**Acétone/eau**) et (**EtOH/eau**) pour les deux plantes. L'extraction par EtOH/H₂O est la plus riche en polyphénols, flavonoïdes, et tanins, ceci est en accord avec l'étude récente faite par (**Bettaieb**, 2016) qui a trouvé que l'éthanol présente le meilleur extractant.

L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. (**Hagermann et al.**, 2000) ; Selon (**Iqbal et al.**, 2012) l'utilisation d'un solvant à haute polarité, c'est-à-dire du méthanol, a amélioré la récupération des phénols totaux dans l'extrait.

En outre, l'auteur a déclaré que l'efficacité de différents solvants pour l'extraction des phénols a été ordonnée du plus élevé au plus bas, méthanol> eau> éthanol> acétone> chloroforme> hexane (Yuliana et al., 2014).

III. 2.1. Dosage des Saponines

La teneur en saponines de chaque extrait des deux plantes a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la digitonine précédemment réalisée (Figure II.3) et exprimée en milligrammes équivalent de la digitonine par gramme de matière sèche. Les résultats sont résumés dans le (Tableau III.4).

Tableau III.4. Teneur en saponines de différents extraits dans les plantes étudiés

Partie de la plante	Fraction	Teneurs des saponines « mg EDIG/g MS»
<i>Cupressus</i> (Les Cônes)	Ac.Et	<u>119,85</u>
	N-but	10,48
<i>Cupressus</i> (Les graines)	Ac.Et	<u>131,46</u>
	N-but	22,10
<i>Achillea</i>	Ac.Et	14,23
	N-but	16,47

Dans le tableau ci-dessus, nous constatons que les teneurs en saponines varient d'une fraction à une autre suivant les conditions et les solvants utilisés.

Les teneurs en saponines dans les fractions d'acétate d'éthyle sont nettement supérieures à celles des fractions butanoliques, les extraits d'acétate d'éthyle de la plante *Cupressus* (les graines et les cônes) sont les plus riches en saponines avec des teneurs de (131,46 mg EDIG/g d'extraits) et (119,85 mg EDIG/g d'extraits) respectivement.

les travaux de (**Seyyed** et *al.*, 2006), ont signalé que les extraits éthanoliques dégraissés des fruits, branches terminales et des feuilles de *C sempervirens* , ont été étudiés qualitativement pour présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de saponines et des tanins.

Les quantités de composés non volatils dans les feuilles de *C. sempervirens* n'étaient pas significatives mais les fruits, étaient relativement riches en tanins et saponines. (**Seyyed** et *al.*, 2006).

D'autres études ont aussi montré que les feuilles et les fruits de *C. horizontalis* étaient assez riches en saponines et en tanins alors que les quantités de flavonoïdes et d'alcaloïdes n'étaient pas très élevées dans les deux parties de cette espèce (**Seyyed** et *al.*, 2006).

Par contre l'*Achillea* possède une teneur des saponines mais faible par rapport à *C. Sempervirens* avec une teneur (14,23mgE DIG/g MS) dans l'extrait Ac.Et.

En plus, si on compare nos résultats par rapport à d'autres plantes du même genre (**Hoffmann**, 2003), tel que l'*Achillea millefolium* ; c'est la plante la plus riche en saponines et l'*Achillea wilhelmsii*, les deux appartiennent aux *Asteraceae*, contiennent des alcaloïdes, des flavonoïdes, des terpénoïdes, des huiles volatiles, des sesquiterpènes lactones et des saponines (**Sharififar** et *al.*, 2009).

Les extraits éthanoliques ont été concentrés sous pression réduite et ont analysé dont le but de la mise en présence d'alcaloïdes (**Evans**, 2002), de flavonoïdes (**Markham**, 1982), de saponines (**Hostetman**, 1995) et de (**Bruneton**, 1999)

L'éthanol et le méthanol étaient les solvants d'extraction utilisés pour extraire les saponines du matériel végétal, et l'éthanol préfère mieux probablement en raison d'une préoccupation favorable à l'environnement. (**Huhman** et *al.*, 2005; **Lee** et *al.*, 2009)

À partir de ces résultats, nous pouvons conclure que les graines et les cônes de *C. sempervirens* sont les plus riches en saponines et pauvres en phénols totaux et flavonoïdes, par contre l'*Achillea* est moins riche en saponines et les phénols totaux.

III. 3. Effet inhibiteur des différents extraits des deux plantes sur l' α -amylase

En vue de repérer les extraits ayant une capacité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase, des tests d'inhibitions ont été effectués. La concentration était limitée à 0,5 g/l. Les taux d'inhibition ont été calculés pour chaque dilution et les résultats sont résumés dans le (Tableau III.5).

Tableau III.5. Taux d'inhibition des extraits phénoliques des plantes étudiées vis-à-vis L' α -amylase.

Partie de la plante	Fraction	Taux d'inhibition (%)
<i>Cupressus sempervirens</i> (Les Cônes)	Act Et (Acétone/eau)	13,76
	Act Et (EtOH/eau)	<u>20,16</u>
	N-but (EtOH/eau)	<u>22,88</u>
<i>Cupressus sempervirens</i> (Les Graines)	Act Et (Acétone/eau)	11,08
	Act Et (MeOH/eau)	12,50
	N-but (EtOH/eau)	10,08
<i>Achillea santolina</i>	Act Et (Acétone/eau)	18,25

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que tous les extraits ainsi préparés inhibent l' α -amylase avec différents taux d'inhibition. Les valeurs calculées sont comprises entre 10,08 et 22,88 %. Les pourcentages d'inhibition les plus importants sont remarqués pour les cônes de *Cupressus sempervirens* L dans l'extrait N-but (22,88%), et Act Et (20,16%) issus de même macération (éthanol/eau), tous les extraits ont eu des pourcentages d'inhibition < 50%. Le pourcentage d'inhibition révèle que les extraits dans l'extraction issus des systèmes de solvant (éthanol/ eau) sont les plus importants que le système de solvant (acétone/ eau).

Cette différence d'inhibition est due peut être à la nature du solvant, aussi aux méthodes d'extraction (**Mohammedi** et **Atik**, 2011) et (**Tundis** et *al.*, 2010). En plus, nous pouvons déduire que l'effet inhibiteur de cette enzyme par nos extraits, implique probablement la présence des groupements glycosidiques dans les squelettes phénoliques et/ou flavonoïdiques ou saponosides.

Selon (**Heo** et *al.*, 2009) ; les groupements hydroxyles des composés polyphénoliques ont un rôle important dans la promotion de l'activité inhibitrice. Il a été également démontré que la baisse de l'activité enzymatique dépend de la concentration ainsi que du nombre et la position des groupes hydroxyles des composés.

D'autre part, nous constatons que la plante *Achillea santolina* possède une activité inhibitrice avec un taux 18,25 % ; l'auteur (**Najim Abbas** ; 2013) ; utilise en médecine traditionnelle l'*Achillea santolina* contre le diabète, on peut expliquer l'action anti - hyperglycémiant de son extrait, par l'inhibition de l' α -amylase.

La phytothérapie antidiabétique connaît à ce jour un essor important du fait de la découverte de plus en plus d'extraits de plantes efficaces dans le traitement du diabète. L'utilisation d'extraits de plantes est une pratique courante en médecine traditionnelle africaine (**Jaykar** et **Suresh.**, 2003).

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** et *al.*, 2004).

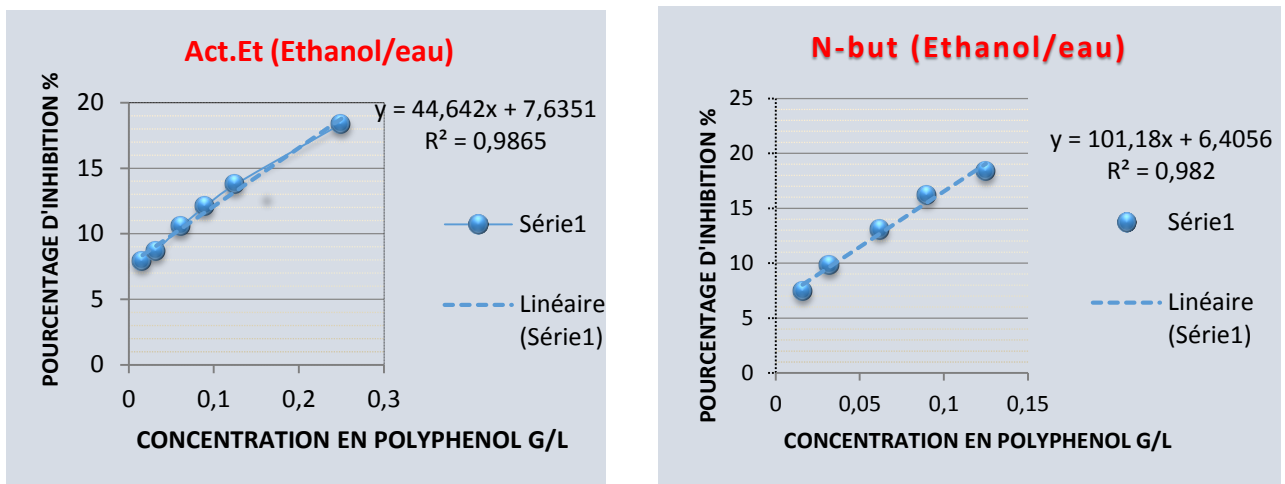
Par ailleurs les extraits N-but et Ac.Et qui ont une quantité faible en polyphénols et flavonoïdes inhibent faiblement l' α -amylase. De ce fait on constate que les polyphénols et les flavonoïdes ne sont pas les seules molécules qui influent sur l'activité enzymatique d' α -amylase, c'est une synergie entre les différents métabolites présents dans l'extrait, polyphénols, flavonoïdes, saponosides et d'autres molécules.

III. 3.1. Etude du pouvoir anti-amylasique

D'après les résultats précédents, deux extraits ont été choisis pour procéder à l'étude de l'activité anti-amylase. Afin de déterminer pour chaque extrait et dans les mêmes conditions réactionnelles le paramètre IC_{50} qui présente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse réactionnelle jusqu'à 50% de sa valeur maximale non inhibée. Pour les autres extraits possèdent des pourcentages d'inhibition faibles, les courbes présenté dans l'annexe 1 et 2.

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

Les figures présentées ci-dessous, montrent les valeurs obtenues (%PI de chaque extrait) qui nous ont permis de tracer les graphes des différences proportion d'inhibition en termes de concentration des composés phénoliques ($PI\% = f(C)$).



FigureIII.6. Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition $PI\%$ en fonction de la concentration en phénols des extraits d'Ac.Et, et de N-butanol issus de l'extraction (éthanol/eau) partie des cônes de la plante *Cupressus sempervirens*.

Si on suppose qu'il ne y'aura pas de saturation jusqu'à le taux d'inhibition 50 %, les représentations graphiques de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en extraits, nous ont permis de déterminer les valeurs d'IC₅₀ pour les deux extraits que nous avons regroupés dans le **Tableau III.6** si dessous :

Tableau III.6. Valeurs des IC₅₀ des extraits Act Et et N-but (éthanol/eau) pour les cônes de *Cupressus sempervirens L* vis-à-vis de l' α -amylase

Les plantes	Fraction	Les IC ₅₀ (mg/ml)
<i>Cupressus sempervirens</i> cônes	Act Et (EtOH/eau)	1,12
	N-but (EtOH/eau)	0,49

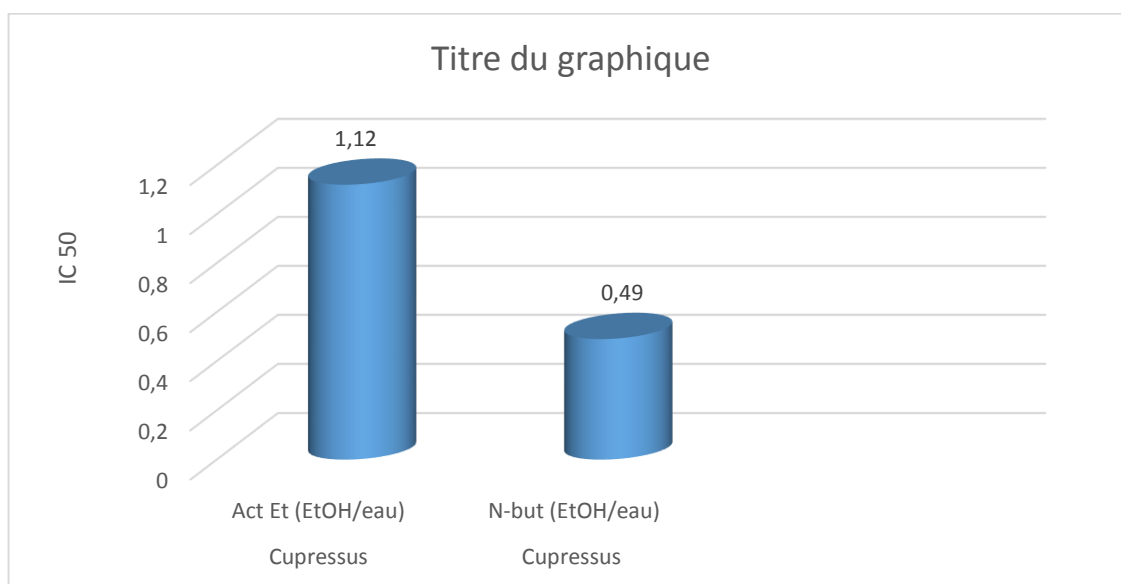


Figure III.7. Histogrammes représentant les valeurs d'IC₅₀ d'extraits Act-Et et N-but des cônes par l'extraction (Ethanol/eau)

D'après les résultats décrits ci-dessus, les deux extraits choisis ont montré une activité inhibitrice avec des taux d'IC₅₀ de 0,49 mg/ml pour le N-but et 1,2 mg/ml pour Act-Et issus de système (éthanol/eau).

Ainsi, nous remarquons que l'extrait butanolique des cônes de la plante *Cupressus sempervirens* présente une activité plus élevée, ceci peut être attribué à la présence d'un groupe de molécules phénoliques dont la structure conférant une activité inhibitrice plus efficace. Comme les saponines sont riches en propriétés pharmaceutiques et récemment, de nombreuses études mettent l'accent sur la capacité des saponines à posséder des propriétés antidiabétiques et anti-obésité (**Joseph et Jini**, 2013 ; **Yang et al.**, 2010).

Une étude qui a été menée par (**Yang et al.**, 2010), sur des espèces de *Panax notoginseng* a montré que les saponines ont des effets antihyperglycémiques et anti-obésités qui peuvent être bénéfiques pour les patients diabétiques de type 2 en améliorant la sensibilité à l'insuline et en diminuant la résistance à la leptine.

Une saponine triterpénoïde typique de charantine dérivée de *Momordica charantia* est un composé bioactif antidiabétique bien connu (**Joseph et Jini**, 2013; **Raman et Lau**, 1996).

D'autres études de recherche antérieures sur les inhibiteurs de l' α -amylase identifiés à partir d'herbes médicinales recommandent qu'un nombre d'inhibiteurs appartiennent à une classe de flavonoïdes présentant des caractéristiques inhibitrices d'activités de l' α -amylase (**Fariba et al.**, 2009).

Les travaux conduits par (**Kandra et al.**, 2004) confirment nos résultats en indiquant que plusieurs 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 grâce à son richesse des groupements hydroxyles. Les tanins se fixent aux α -amylases, la liaison peut avoir lieu sur le site actif de l'enzyme, ces liaisons engendrent des complexes du type enzyme-inhibiteur, puisque les tanins agissent comme inhibiteurs compétitifs des α -amylases (**Kandra et al.**, 2004).

Conclusion Générale

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'étude de l'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits de deux espèces *Cupressus sempervirens L* et *Achillea santolina* collectées de la région du Laghouat. Notre objectif est l'étude de l'activité biologique in vitro des certains métabolites secondaires ; composés phénoliques totaux, flavonoïdes et les saponines.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des différentes étapes d'extraction impliquant divers solvants pour les deux plantes choisies. En second lieu, nous avons procédé à la quantification des composés phénoliques par des méthodes spectrophotométriques. Tandis que l'évaluation des composés flavonoïdiques a été effectuée par dosage compléxométrique avec le trichlorure d'aluminium, et la quantification des saponines en utilisant la vanilline comme réactif.

Les résultats montrent clairement que les teneurs en phénols totaux faible dans les deux plantes ; varient entre 0,081 et 2,59 mg en GAE/ gramme de la matière sèche, pour tous les extraits d'Ac.Et et N-but dans les deux extractions par l'acétone et éthanol. L'analyse quantitative du contenu en flavonoïdes nous a confortés dans l'idée que ces plantes étaient en possession d'un matériel relativement faible en flavonoïdes. Les quantités des flavonoïdes sont comprises entre 0,011 et 0,77 mg/g équivalent en quercétine. Pour les graines et les cônes de *Cupressus* montre une teneur importante en saponines de 131,46 et 119,85 mg EDIG/g MS, respectivement.

Nos extraits ont été appliqués à l'activité enzymatique de l'enzyme α -amylase, ces testes ont montré que les extraits phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et les saponines) ont des effets inhibiteurs sur cette enzyme, dont la meilleure inhibition a été enregistrée par les cônes de *Cupressus sempervirens* pour les extraits N-but (EtOH/eau) et Act Et (EtOH/eau) avec une teneur de 22,88% et 20,16%, successivement.

Les résultats d'IC₅₀ obtenu, indiquent que ces plantes peuvent être investiguée à des fin pharmaco-thérapeutique, et notamment, l'extrait N-but (EtOH/eau) de *Cupressus sempervirens L* (cônes) qui est présente les plus faibles valeurs de constante d'inhibition avec une teneur de (IC₅₀ = 0,49mg/ml).

Nous concluons à partir de cette étude que les extraits de *Cupressus sempervirens* et *Achillea santolina* constituent une source en composés phénoliques et saponines douées d'activité anti-amylasique. Ce qui nous encourage à approfondir la recherche pour caractériser les molécules responsables à cette inhibition, fractionner et identifier certains composants majoritaires dans ces plantes et tester leur effet *in vivo*.

Les références bibliographiques

Les références bibliographiques

1. **ADA** (American Diabetes Association)., 2008. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 31(1): S55-S60.
2. **ADÃO, C. R., DA SILVA, B. P., PARENTE, J. P** , 2011. A new steroidal saponin from *Allium ampeloprasum* var. *porrum* with antiinflammatory and gastroprotective effects. *Phytochemistry Letters*, 4:306–10.
3. **Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSPS).**, 1999. *Traitement Médicamenteux du Diabète de Type 2* - Février.
4. **Allali, H., Benmehdi, H., Dib, M. A., Tabti, B., Ghalem, S., & Benabadji, N.**, 2008. Phytotherapy of diabetes in west Algeria. *Asian Journal of Chemistry*, 20(4), 2701.
5. **Andreas Kampkötter, Claudia Timpel, Ruben Felix Zurawski, Sven Ruhl, Yvonne Chovolou, Peter Proksch et Wim Wätjen.**, 2008, Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin , *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 149. 314-323pp.
6. **Angioni, A., Barra, A., Russo, MT., Coroneo, V., Dessi, S. and Cabras, P.**, 2003. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J Agric Food Chem.* 51(10): 3073-3078.
7. **Athel cornish-bowden, Marc Jamin et Valdur Saks.**, 2005, cinétique enzymatique, p 7, p 55, first published in 2004 by *Portland Press*, Ltd, London, second published *EDP sciences*.

8. **Azzi R, Djaziri R, Lahfa F, Sekkal FZ, Benmehdi H, Belkacem N.,** 2012. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(10), 2041-2050.
9. **Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Vasseur J, Cazin M, Cazin JC, Pinkas M.,** 1996. Arzneimittelforschung : Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Nov*;46 (11):1086-9.
10. **Bahorun, T.,** 1997. Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius* , 83 pp.
11. **Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., and Waley, S. G.,** 1975. Structure of chicken muscle triose phosphates isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution: using amino acid sequence data. *Nature* 255, 609-614.
12. **Bedekar, A., Shah, K., & Koffas, M.,** 2010. Natural products for type II diabetes treatment. *Advances in applied microbiology*, 71, 21-73pp.
13. **Benfeld P.** 1955. Amylases α and β : *Method Enzymol* 1:149-58pp.
14. **Bérubé-Gagnon, J.,** 2006. Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Québec 67 pp.
15. **Bettaieb rebey., J. Sriti., B. Besbess., K. Mkaddmini hammi, I., Hamrouni sellami, B., Marzouk, R., Ksouri.,** 2016. Effet de la provenance et du solvant d'extraction sur

lateneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes des graines de fenouil (*Foeniculum vulgare Mill.*), 27(4), 2286-5314.

16. **Boudiaf, K.**, 2006. Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Thèse de magistère. Département de biologie. *Université Ferhat Abbas*. (Sétif) Algérie. 25 pp.
17. **Bruneton J.**, 1999. *Pharmacognosie Phytochimie Plantes medicinales*. Paris: TEC & DOC; 381-5. (Bruneton.,1999)
18. **BRUNETON, J.** 2009. Pharmacognosie – Phytochimie, Plantes médicinales, Tec & Doc, *Médicales internationales* (Eds.), 4e édition
19. **Cairnes, DA., Ekundayo, O. and Kingston, DGI.**, 1980. Plant anticancer agents. X. Lignans from *Juniperus phoenicea*. *J. Nat. Prod.* 43:495-497.
20. **CAMUS A.**, 1914 – Les Cyprès (genre *Cupressus*) : Monographie, systématique, biologie, culture et principaux usages. *Ed. Paul Le chevalier. Paris*, 106 p.
21. **Castellucci, F.**, 2013. détermination de l'activité β -glucanase (β 1-3 , β 1-6) dans les préparation enzymatique. C OIV 2013.
22. **Claude Bennett J., M.D.**, 1997. Cecil Traité de *medecine interne*. 1ère édition française.
23. **Comte G., Allais D.P., Chulia A.J., Vercauteren J., Bosso C.**, 1996. Phoeniceroside, The First Natural Bis-Furanone Propane Derivative From *Juniperus phoenicea* L. *Tetrahedron letters*. 37 (17) : 2955-2960.
24. **Cosentino S., Tuberoso CIG., Lisano B.** 2003. Sarinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*.29:130-135pp.
25. **Da Silva, S-M., Koehnlein E.A., Bracht A., Castoldi R., Morais G.R., Baesso M.L., Peralta R.A., Souza C.G.M., Sá-Nakanishi A.B., Peralta R.M.**, 2014. Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a *pinhão* coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Food Res. Int.* 56:1–8. doi: 10.1016/j.foodres.2013.12.004.

26. **Dacosta, E.**, 2003. Les phytonutriments bioactifs. *Molecules*. 317pp.
27. **Delaveau, P.**, 1978. Grande bardane, *Act. Pharm.*, 145, 53-54pp.
28. **Digrak. M., Bagci. E and Hakki Alma .M.**, 2002. Antibiotic action of seed lipids from five tree species grown in Turkey, *Pharmaceutical Biology*; 5 pp.
29. **Dixon, R. A. & Paiva, N. L.**, 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.
30. **Djeridane A, M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker, N. Vidal.**, 2005. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*; 1-7pp.
31. **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N.**, 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654–660 pp.
32. **Donatien, K.**, 2008. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes- extraction, identification d'alcaloïdes- caractérisation, quantification de polyphénols : Etude de leur Activité antioxydant. Thèse de doctorat. *Université Paul Verlaine de Metz- UPV-M. France*, 188 p.
33. **DONZO M., SARR, DIOP M., SAMB, BASSENE et BARRYM.S.**, 2015. Dosage des flavonoïdes totaux et détermination du pouvoir antioxydant dans l'extrait brut des écorces de tronc de *Uapaca togoensis* (Aub. et Léan.) Pax. *ElWahat pour les Recherches et les Etudes* Vol.8 n°1: 11 – 18pp.
34. **Douglass F, Patel S, Travis M, Emma E, Winkel.**, 2007. Vanillin Synthesis from 4 Hydroxybenzaldehyde, *J. Chem. Ed.*:84 (7): page 1158, **DOI:** 10.1021/ed0841158 pp.

35. **Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., Yousefzadi M.,** 2008. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages. *Food chemistry.*, 927-931 : 110pp.
36. **El-Sawi, S.A., Motawae, H.M. and Amal, M.A.,** 2007. Chemical Composition, Cytotoxic Activity and Antimicrobial Activity of Essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea*. Grown in Egypt. *African J.of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, **4(4)** : 417-426
37. **Epifano F., Genovese S., Menghini L. and Curini M.,** 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Photochemistry*; 68: 939-953pp.
38. **Escribano. B. M.T., Santos. B. C.,** 2003. Polyphenol extraction from foods. *In:* SANTOS-BUELGA C., WILLIAMSON G. (Eds): *Methods in polyphenol analysis. Royal Society of Chemistry, Cambridge, United King Dom*, 1-16pp
39. **Evans W.C.,** 2006. *Pharmacognosy*, V.C Saunders, 585 pp.
40. **Evans WC.,** 2002. *Trease and Evans' Pharmacognosy*. London: W.B. Saunders, 15th ed.; p. 336
41. **Fariba, S., D.N. Gholamreza and M. Mansour.,** 2009. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L). *Food Chemistry*, 112(4): 885-888.
42. **Gérard Raverot.,** 2005. *Endocrinologie métabolisme réanimation – urgences, Diabète sucre de types 1 et 2 de l'enfant et de l'adulte*. Servier; 63: 4.
43. **Gilani A.H., Jabeen Q., Ghayur M.N., Janbaz K.H., Akhtar M.S.,** 2005. Studies on the Antihypertensive, Antispasmodic, Bronchodilator and Hepatoprotective activities of the *Carum copticum* seed extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 127-135 pp.
44. **Gow-ChinYen, Pin-Der Duh, Hui-LingTsai.,** 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid , *Food Chemistry*, vol. 79, 307-313pp.

45. **Guidi L, Degl'Innocenti E, Genovesi S, Soldatini GF.**, 2005. Photosynthetic process and activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in resistant and sensitive genotypes of *Lycopersicon esculentum* L. exposed to ozone. *Plant Science* 168: 153-160.
46. **Hagerman A-E ., Muller-Harvey I ., Makkar H-P-S.**, 2000. Quantification of tannins in tree foliage. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear *Techniques in Food and Agriculture*. Vienna 26 pp.
47. **Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., & Poutanen, K.**, 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International journal of molecular sciences*, 11(4), 1365-1402.
48. **Hartmann, T.** 2007. From waste products to Eco chemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68(22-24): 2831-2846.
49. **Heo, S -J, Hwang, J-Y., Choi., J-I., Han J-S, Kim., H-J, Jeon Y-J.**, 2009 Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2009 Aug 1;615(1-3):252-6. Epub 2009 May 29.
50. **Herold Gerd.**, 2012. *Médecine interne*. 4ème édition 695-706.
51. **Hiai S, Oura H, Nakajima T. Color.**, 1976. Reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Med.* **1976** Mar;29(2):116-22
52. **Hotsettmann K. Marston.A**, 1995. *Saponins (Chemistry and Pharmacology of Natural Products)* Published by Cambridge University Press (1995) ISBN 10: 0521329701 ISBN 13: 9780521329705.
53. **Huhman DV, Berhow MA, Sumner LW.**, 2005. Quantification of saponins in aerial and subterranean tissues of *Medicago truncatula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1914-1920. 53pp.

54. **Iqbal, S., U. Younas, K.W. Chan, M. Zia-ul-haq and M. Ismail.**, 2012. Chemical composition of *Artemisia annua* L. leaves and antioxidant potential of extracts as a function of extraction solvents. *Molecules* 17 : 6020-6032.
55. **Jayakar B, Suresh B.**, 2003. Antihyperglycaemic effect of *Aporosa Lindleyana* in normal and alloxan induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*; 84(2-3),247-249.
56. **Joseph, B. and Jini, D.**, 2013. Antidiabetic Effects of *Momordica charantia* (Bitter Melon) and Its Medicinal Potency. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3, 93-102pp.
57. **Kandra, L., Guémant G., Zajacz, A., Batta, G.**, 2004. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. (319): 1265-1271.
58. **Kim DO., Lee KW., Lee HJ., Lee C.Y.**, 2002. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*; 50: 3713-3717 pp.
59. **LACAILLE-DUBOIS, M.-A., DELAUDE C., MITAINE-OFFER A.-C.**, 2013. Triterpenoid saponins: a focus on Polygalaceae in Handbook of Natural Products, K.G. Ramawat, J. M. Mérillon (Eds.), *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. Chapter 104,pp.
60. **Lamaison JL, Carnat A, Petitjean-Freytet C, Carnat AP.**, 1991. Quercetin-3-glucuronide, main flavonoid of *Alchemilla*, *Alchemilla xanthochlora* Rothm. (Rosaceae). *Ann Pharm Fr.* 49(4) :186-9.
61. **Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y.**, 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*, 51 : 7292-7295.

62. **Leland J Cseke; Ara Kirakosyan; Peter B Kaufman; Sara L Warber; James A Duke and Harry L Brielmann.** Natural Products from Plants. 2^{ème} Edition, London New Yourk. 2006 by Taylor and Francis Group.
63. **M. Yousfi, A. Djeridane, B. Nadjemi, S. Maamri, F. Djireb, P. Stocker.,** December 2006, Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase, *J Enzyme Inhib Med Chem*, Volume 21, No 6, pp 719-726.
64. **Maarouf A ., 2000.** Dictionnaire botanique Pp 129.
65. **Macheix J-J, Fleuriet. A, Jay-Allemand. C.,** 2005, les composes phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, *presses polytechniques et universitaires romandes*, 67-162 pp.
66. **Malon.** Sept. 1991; 10^{ième} Journées Internationales HE, Digne-les-Bains 5-6-7, 28 pp.
67. **MARCELLO I. – PAOLO R. et CLAUDINE A.,** 2004 – Les espèces de Cyprès. CYPMED. *INTERREG III B. MEDOCC.* Corte, 100 pp.
68. **Markham, K.R.,** 1982. Techniques of flavonoid identification. *Academic Press.* London, 5 pp.
69. **Merghem R., Jay M., Viricel M. R., Bayet C. et Voirin B.,** 1995. Five 8-C benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry.*, 38 (3) : 637-640 pp.
70. **Meziti. A.,** 2009. Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L Étude *in vitro* et *in vivo*. *Thèse de magister.* Université Ferhat Abbas. Setif. 105 pp.
71. **Miliauskas. G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A.,** 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry.*, 85: 231-237.
72. **Miller G-L.,** 1956. Analytical chemistry. Pioneering plante Research Division, Quarfermasfer Researcg and Engineering Centre, Natick, Mass.

73. **Mohammedi, Z., Atik, F.,** 2011. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. *Inter. J. Pharma. Bio. Sci.*(2): 609-615.
74. **Muthus, C., Ayyanar, M., Raja, N., and Ignacimuthu, S.,** 2006. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **2:43** doi:10.1186/1746-4269-2-43.
75. **Najim Abbas Jabir Al-Awwadi,** 2013. Anti diabetics effect of *Achillea santolina* aqueous leaves extract. *nternational Journal of Medicinal Plants Research*. ISSN 2169-303X Vol. 4 (7), pp. 151-156.
76. **Nathalie Boizot, Jean-Paul Charpentier.,** 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, *Laboratoire d'Analyses Biochimiques*, BP 20619 Ardon – 45166.
77. **Ollivier D., Soulliol S., Noyer C., Guère M., Artaud J.,** 2001. Optimisation de l'analyse des triglycérides et des phénols dans les huiles végétales par chromatographie liquide. *Annales des Falsifications de l'Expertise Chimique et Toxicologique*, 94(956), 291-295pp.
78. **OMS.,** 2016. Organisation mondiale de la Santé.. Rapport mondial sur le diabète. Genève.
79. **Payen et Persoz.,** 1833. la diastase, les principaux produits de ses réactions et leurs applications aux arts industriels », *Annales de chimie et de physique*, 2^e série, t. 53, pp. 73-92.
80. **PDB** (protein data base). 2006. Alpha-amylases. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1KG>

81. **Perla, V., & Jayanty, S. S.**, 2013. Biguanide related compounds in traditional antidiabetic functional foods. *Food chemistry*, 138(2), 1574-1580.
82. **PODOLAK , I., GALANTY, A., SOBOLEWSKA, D.**, 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9:425–74.
83. **Raj Bhandari Megh, Nilubon Jong-Anurakkun and Jun Kawabata.**, 2008. ANTIDIABETIC POTENTIAL OF NEPALESE HERBAL AND FOOD PLANTS *Laboratory of Food biochimstry. Division of applied Bioscience, Graduate of Agriculture, Hakkaido University sapporo-8589. Japan*
84. **Rakotonanahary, M.**, 2012. thèse présentée pour l’obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d’état, université Joseph Fourier. p16, 19, 27, 28.
85. **Raman, A.; Lau, C.**, 1996. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). *Phytomedicine* , 2, 349–362.
86. **Ramírez, G., Zavala, M., Pérez, J., & Zamilpa, A.**, 2012. In vitro screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
87. **Ribéreau-Gayon P.**, 1968. Les composés phénoliques des végétaux. *Editions Dunod*, Paris 254 pp.
88. **Rodier M.**, 2001. Définition et classification du diabète. *Médecine Nucléaire – Imagerie fonctionnelle et métabolique* ; 25 (2) : 5-18.
89. **Sales, P. M., Souza, P.M., Simioni, L. A., MagaJhes, P.D.O., Damaris, S.**, 2012. α amylase Inhibitors : A review of raw material and isolated compounds from plant source. *Pharmaceut Sci.* 15(1): 142-183.
90. **Sandberg. F and Corrigan .D.**, 2004. Natural Remedies “Their Origins and Uses”, *Taylor & Francis*; 178 pp.

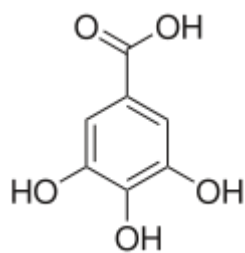
91. **Santé médecine.**, 2016. journaldesfemmes.com.; Cyprès - Bienfaits pour la santé .
92. **SAUTOUR, M., MIYAMOTO, T., LACAILLE-DUBOIS, M. -A.**, 2007. Steroidal saponins from *Asparagus acutifolius*. *Phytochemistry*, 68:2554–62.
93. **Seyyed Ahmad Emami, Javad Asili, Mohammad Rahimizadeh, Bibi Seddigheh Fazly-Bazzaz, Mohammad Hassanzadeh- Khayyat.**, 2006. Chemical and Antimicrobial Studies of *Cupressus sempervirens* L. and *C. horizontalis* Mill. Essential Oils. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences., Spring 2006 : 2(2): 103-108. www.ijps.ir.
94. **Shariffar F, Mohammadi SM, Arabnejad M.**, 2009. **Immunomodulatory activity of aqueous extract of *Achellia wilhelmsii* C. Koch** in mice. Ind J Exp Biol. ;47:668–71pp.
95. **Singleton, V.L.; Rossi, J.A.**, 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. Am. J. *Enol. Vitic.*, 16, 144-158pp.
96. **Sylvie MOREL**, 2011. Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Thèse de doctorat Biochimie, Biologie Moléculaire. *Université d'Angers*, Français. *Laboratoire Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux*. 56pp.
97. **Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, Get Kaur, H. Jan-Mar.**, 2011. Phytochemical screening and extraction, *Internationale Pharmaceutica Scinencia*. 10 pp.
98. **Tundis, R., Loizzo MR, Menichini, F.**, 2010. Natural products as alpha-amylase and alphasglucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Rev Med Chem*, 10:315-331.
99. **VERMEERSCH, M., FOUBERT, K., DA LUZ, R. I., PUYVELDE, L. V., PIETERS, L., COS, P., MAES, L.**, 2009. Selective antileishmania activity of 13,28

epoxyoleanane and related triterpene saponins from the plant families Myrsinaceae, Primulaceae, Aceraceae and Icacinaceae. *Phytotherapy research*, 23:1404–10pp.

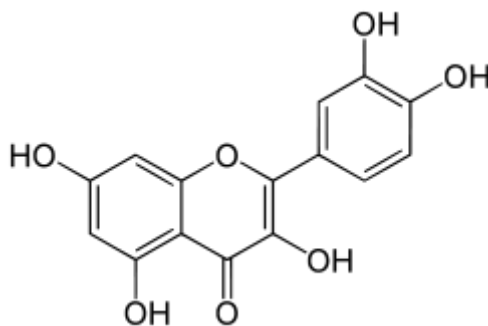
100. **Watson, Frank D.; James E. Eckenwalder.**, 2013. "Cupressaceae Bartlett: Redwood or Cypress Family". eFloras. Missouri Botanical Garden. Retrieved 6 September 2013.
101. **Worsztynowicz Paulina, Marta Napierała, Wojciech Białasa, Włodzimierz Grajeka, Mariola Olkowicz.**, 2014. Pancreatic α -amylase and lipase inhibitory activity of polyphenolic compounds present in the extract of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L. *Department of Biotechnology and Food Microbiology, Poznan University of Life Sciences*, 14pp.
102. **WWW.Tela-botanica.org.**, 2013. Fiche eflorale d'Achillea Sanolita. ISFAN v.
103. **Yang CY, Wang J, Zhao Y, Shen L, Jiang X, Xie ZG, Liang N, Zhang L, Chen ZH.**, 2010. Anti-diabetic effects of Panax notoginseng saponins and its major anti-hyperglycemic components. *Jornal of Ethnopharmacol.* (2):231-6. doi: 10.1016/j.jep.2010.04.039. Epub 2010 May 8.
104. **Yuliana. P, Laconi. E.B, Wina. E and Jayanegara. A.**, June 2014. EXTRACTION OF TANNINS AND SAPONINS FROM PLANT SOURCES AND THEIR EFFECTS ON *In vitro* METHANOGENESIS AND RUMEN FERMENTATION. *Indonesian Research Center for Animal Production*, Ciawi, Bogor 16002 – Indonesia ; Indonesian Trop. Anim. Agric., ISSN 2087-82739(2):91-97pp.

Annexe

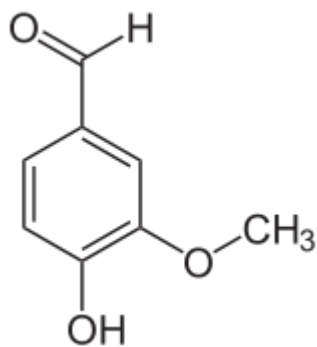
Figures.15. Les structures chimiques de quelques composés



L'acide gallique



La quercétine ou quercétol



La vanilline

L'acide gallique :

L'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque) est un composé organique aromatique, largement répandu dans les plantes soit sous forme libre soit comme composant des gallotanins.

Il est classé dans les acides-phénols (ou acides phénoliques) puisqu'il comporte à la fois une fonction carboxylique et des hydroxyles phénoliques. Et comme il est dérivé de l'acide benzoïque, on le classe aussi dans les acides hydroxybenzoïques (**Gow-ChinYen et al., 2002**).

La quercétine :

La quercétine ou quercétol est un flavonoïde de type flavonol présent chez les plantes comme métabolite secondaire.

Le quercétol est le plus actif des flavonoïdes et de nombreuses plantes médicinales doivent leur efficacité à leur fort taux en quercétol (**Andreas et al., 2008**)

La vanilline :

La vanilline est un composé très volatile, sa pression de vapeur saturante est élevée. Quand nous flairons un produit alimentaire qui contient l'arôme de vanille, nous aspirons une portion d'air qui environne le produit. Celle-ci est chargée en composés odorants (**Douglass et al., 2007**).

Préparations des testes

1. Préparation du tampon phosphate (1L) pour l'enzyme :

- K_2HPO_4 : 0,87 g;
- KH_2PO_4 : 0.68 g ;
- KCL: 09 g ;
- pH= 7,0 \pm 0.2.

2. Préparation du réactif DNS pour 500ml :

- DNS: 2,5g
- Phénol cristallin: 0,5 g ;
- Double tartarate de Na et K: 50 g ;
- Sulfit de sodum: 0,125g ;
- NaOH : 5g ;
- pH= 7,0 \pm 0.2.
- Chaque produit solubilisé séparément dans l'eau distillée puis mélanger une fiole de 500 ml

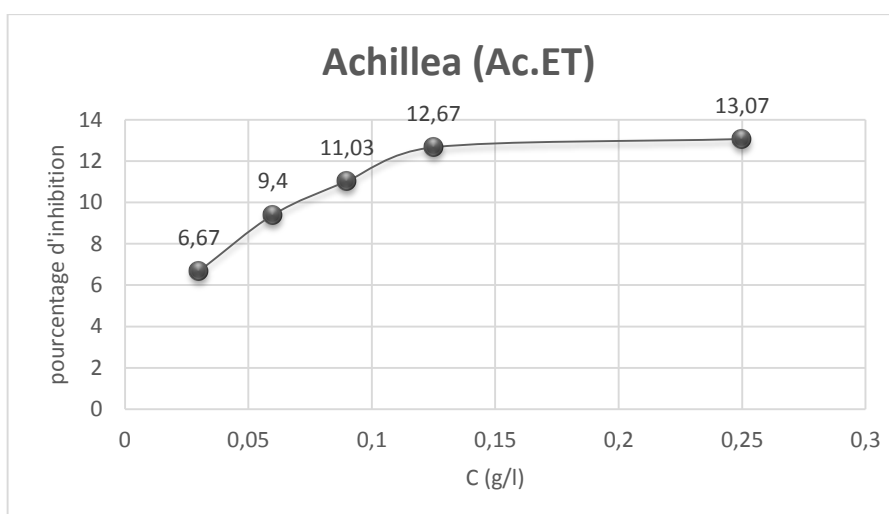
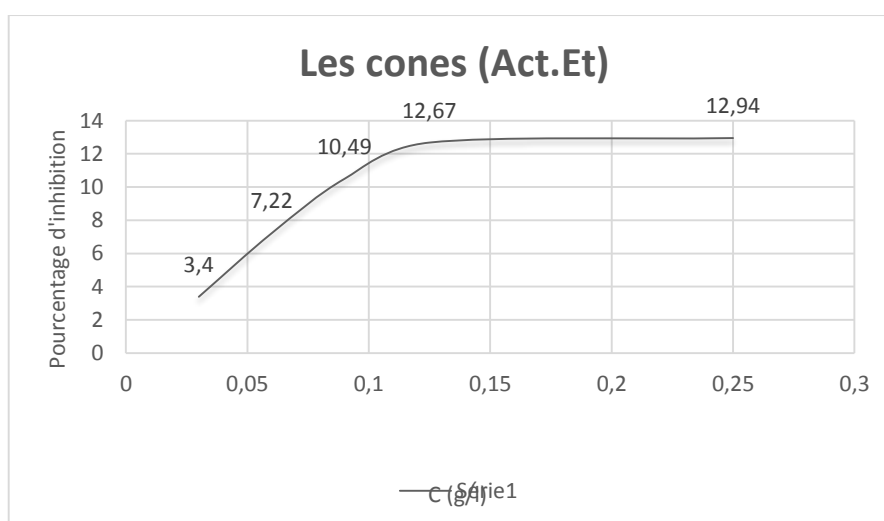
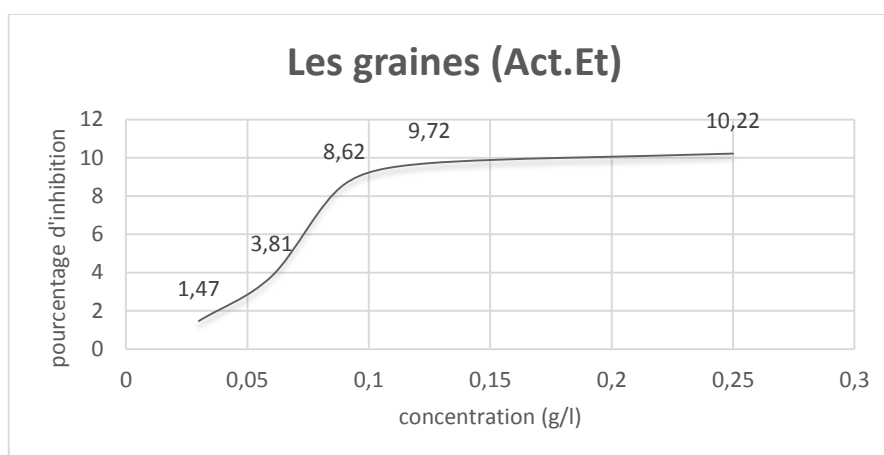
3. Préparation de l'enzyme :

- Enzyme : 0,0037 g
- Tampon phosphate : 10 ml
- Préparation chaque 48h.

4. Préparation du substrat :

- Amidon : C sm= 10g/l
- Préparé chaque semaine

Annexe 01 : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en phénols des extraits d' A c. Et issus d'une extraction (acétone/eau) de les graines et les cônes (Cupressus) et l'Achillea



Annexe 02 : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'une extraction (éthanol/eau) des graines (Cupressus) et l'Achillea

