



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة عمّار ثليجي بالأغواط

Université Amar Telidji Laghouat

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم علوم المادة

Département des Sciences de la Matière



Mémoire de MASTER

Domaine : Sciences de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie organique appliquée

Par :

OULHADJ Fatima

THEME

Valorisation de l'activité antidiabétique *in vitro* de l'extrait hydrométhanolique de *Salsola vermiculata L.*

Soutenu publiquement le devant le jury composé de :

M ^r . Mohamed BENALIA	MCB	Président
M ^{me} . Chahrazed HAMIA	MCB	Examinatrice
M ^{lle} . Hadjer BOUSSOUSSA	MCB	Examinatrice
M ^r . Amar DJERIDANE	Professeur	Rapporteur
M ^{me} . Aicha HAMDI	MAA	Co-rapporteur

Année Universitaire 2016/2017

Dédicace

Je dédie ce mémoire

Pour être pas de mots qui sont morts de leur droit.

Pour les numéros ne peuvent pas être compté les vertus.

*Pour mes parents ma mère, B. ZOÛRA, que je ne cesse de remercier
pour tout ce qu'elle m'a donné. Que Dieu la récompense pour tous
ces bienfaits.*

*Et mon papa, Monsieur ABDEÛRAHMANE, qui a toujours cru
en moi et a mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour
que je réussisse dans mes études*

*A mes frères Mohamed, Ilias et mes soeurs Zineb, Samiha, Siham
et Imane*

À toutes ma famille, grande et petite

A mes amies et mes camarades, pour les moments passés ensemble

*Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs
encouragements.*

*Sans oublier tout les professeurs que ce soit du primaire, du moyen,
du secondaire ou de l'enseignement supérieur*

Je vous aime tous et j'espère que la vie vous préservera

Plein de bonheur,

De réussite, de prospérité et une très bonne santé.

Fatima



Remerciements

En premier lieu, je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et courage pour réaliser ce travail.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire des sciences fondamentales à l'université Amar Thelidji Laghouat. Ainsi, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à monsieur le professeur, YOUSFI Mohammed directeur du laboratoire des sciences fondamentales, pour m'y avoir accueillie durant la réalisation de ce travail et m'avoir permis de le mener dans de bonnes Conditions.

J'adresse mes plus sincères remerciements à mon encadreur Monsieur le professeur DJERIDANE Amar. Tout ce travail lui doit beaucoup, il m'a initié à la recherche, m'a transmis ses connaissances. Je le remercie pour avoir accepté de m'encadrer et pour diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'accordé m'ont permis de mener à de meilleurs résultats.

J'exprime toute ma reconnaissance à ma co-promotrice, M^{me}, HAMDI Aicha, pour son aide et pour tous les efforts qu'elle a consenti tout au long de l'élaboration de ce travail, par sa gentillesse, sa disponibilité et son immense savoir-faire.

Je remercié aussi les membres de jury qui nos ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce mémoire.

Je souhaiterais également remercier laboratoire de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) Laghouat qui a mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail tout au long la période de recherche qu'il ici mon respect et reconnaissance.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire des sciences fondamentales qui, grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur, m'ont soutenu en rendant agréables les moments de travail.

Un grand merci aussi pour mes enseignements, qui pendant les années du cursus universitaire.

Finalement, je tiens à remercier mes très chers parents, mes frères et mes sœurs pour leur soutien morale et physique, ainsi qu'à tous mes proches amis qui m'ont toujours soutenu et encouragé même dans les périodes les plus difficiles et à toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à La réalisation de ce travail.



Des abréviations

A₀	: Absorbance en absence de fraction.
A₁	: Absorbance en présence de fraction.
Abs_{éch}	: Absorbance en présence d'antioxydant.
Abs_t	: Absorbance en absence d'antioxydant.
CC	: Chromatographie sur colonne.
CCM	: Chromatographie sur couche mince.
CUPRAC	: Capacité antioxydante de réduction de cuivre.
DPPH	: 2, 2 Di-Phényle-1-Picryl-Hydrazyle.
EC₅₀	: Concentration efficace médiane.
FID	: Fédération internationale du diabète.
IC₅₀	: Concentration de l'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse enzymatique jusqu'à 50 % de sa valeur maximale non-inhibée.
MeOH	: Méthanol.
min	: Minute.
ml	: Millilitre.
PAR	: Pouvoir antiradicalaire.
PI	: Pourcentage d'inhibition.
PR	: Pouvoir réducteur.
R²	: Coefficient de corrélation.
R_f	: Rapport frontal.
UI	: Unité internationale.
UV	: Ultra violette.
V/V	: Volume/Volume.
CLHP	: Chromatographie liquide à haute performance.
ROS	: Espèces réactifs oxygénées.
EC	: Enzyme commission.

Liste des Figures

Figure 1	: Photographie de <i>Salsola vermiculata</i> L	4
Figure 2	: Photo de la plaque CCM analytique des cinq fractions après le regroupement	7
Figure 3	: Photo de la plaque CCM préparative de l'extrait d'acétate d'éthyle	7
Figure 4	: Photo de la plaque CCM préparative de l'extrait butanolique	7
Figure 5	: Schéma récapitulatif de préparation des fractions (1-8)	8
Figure 6	: Corrélation entre le test du DPPH et le test du CUPRAC	19
Figure 7	: Corrélation entre le test d'inhibition de l' α -amylase et le test du DPPH	22
Figure 8	: Corrélation entre le test d'inhibition de l' α -amylase et le test du DPPH	23
Figure 9	: Corrélation entre le test d'inhibition de l' α -glucosidase et le pourcentage en aire du pic qui apparait à la fin des chromatogrammes	25
Figure 10	: Spectre UV de la fraction 1	30
Figure 11	: Spectre UV de la fraction 2	30
Figure 12	: Spectre UV de la fraction 3	30
Figure 13	: Spectre UV de la fraction 4	31
Figure 14	: Spectre UV de la fraction 5	31
Figure 15	: Spectre UV de la fraction 6	31
Figure 16	: Spectre UV de la fraction 7	32
Figure 17	: Spectre UV de la fraction 8	32
Figure 18	: Chromatogramme CLHP de la fraction 1 mesuré à 254nm	33
Figure 19	: Chromatogramme CLHP de la fraction 2 mesuré à 254nm	33
Figure 20	: Chromatogramme CLHP de la fraction 3 mesuré à 254nm	33
Figure 21	: Chromatogramme CLHP de la fraction 4 mesuré à 254nm	34
Figure 22	: Chromatogramme CLHP de la fraction 5 mesuré à 254nm	34
Figure 23	: Chromatogramme CLHP de la fraction 6 mesuré à 254nm	34
Figure 24	: Chromatogramme CLHP de la fraction 7 mesuré à 254nm	35
Figure 25	: Chromatogramme CLHP de la fraction 8 mesuré à 254nm	35
Figure 26	: Pouvoir antiradicalaire des fractions mesurées par le test du DPPH	37
Figure 27	: Pouvoir antiradicalaire des fractions mesurées par le test du CUPRAC	39
Figure 28	: Pouvoir d'inhibition des fractions mesuré par le test du α -amylase	41
Figure 29	: Pouvoir d'inhibition des fractions mesuré par le test du α -glucosidase	43

Liste des Tableaux

Tableau 1	: Réactifs utilisés dans ce travail	5
Tableau 2	: Bilan massique et composition CLHP (254nm) des 8 fractions isolées	15
Tableau 3	: Valeurs d'EC ₅₀ des fractions et standards mesurés par le test de DPPH et le test de CUPRAC	17
Tableau 4	: Valeurs des IC ₅₀ mesurées par les tests d'inhibition de l' α -amylase et l' α -glucosidase	21

ملخص:

تهدف هذه الدراسة الى تقييم الفعل التثبيطي على ألفا اميلاز وألفا غليكوزيداز وكذا تقدير الفعالية المضادة للأكسدة لثمانية أجزاء معزولة من مستخلص المثانول المائي لنبتة *Salsola vermiculata L*.

بينت قيم IC_{50} المتحصل عليها للنشاط المضاد للسكري لهذه الأجزاء أن الجزء 4 اعطى الفعالية التثبيطية ضد ألفا اميلاز ($0,237 \pm 0,004$) ميليغرام/ملييلتر) والألفا غليكوزيداز ($0,057 \pm 0,000$) ميليغرام/ملييلتر) الأكثر أهمية مقارنة بالمشيط المرجعي (الأكربوز).

اظهر تقدير الفعالية المضادة للأكسدة أن نفس الجزء اعطى فعالية مضادة للأكسدة جد عالية مقارنة بمضادي الأكسدة المرجعيين؛ الفيتامين C والفيتامين E. قدرت قيم EC_{50} المتحصل عليها لاختباري DPPH و CUPRAC ب : $0,059 \pm 0,000$ $EC_{50} =$ ميليغرام/ملييلتر و $0,019 \pm 0,000$ $EC_{50} =$ ميليغرام/ملييلتر على التوالي.

تعتبر النتائج المتحصل عليها من خلال هذا العمل خطوة أولى في البحث عن مواد طبيعية فعالة بيولوجيا قادرة على علاج مرض السكري من النوع الثاني للتقليل من الآثار الجانبية للمثبطات الإصطناعية. لكن، ستكون هناك حاجة لإختبارات إضافية من أجل معرفة الجزينات المسؤولة عن هذا النشاط ودراسة تأثيرها في الجسم الحي حتى يمكن إستعمالها طبييا.

الكلمات المفاتيح : ألفا اميلاز، ألفا غليكوزيداز، النشاط المضاد للأكسدة، *Salsola vermiculata*، السكري، الفصل.

Résumé :

Le but de cette étude, est d'évaluer *in vitro* l'effet inhibiteur sur l' α -amylase et α -glucosidase et de mesurer l'activité antioxydante de huit fractions isolées de l'extrait hydrométhanolique de *Salsola vermiculata L*.

Les valeurs d' IC_{50} obtenues de l'effet antidiabétique de ces fractions montrent que la fraction 4 présente l'activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase ($0,237 \pm 0,004$ mg/ml) et α -glucosidase ($0,057 \pm 0,000$ mg/ml) la plus importante comparativement à l'acarbose pris comme inhibiteur de référence.

L'évaluation de l'activité antioxydante montre que la même fraction présente une très bonne capacité antioxydante par rapport à la vitamine C et la vitamine E pris comme antioxydants de référence. Les valeurs d' EC_{50} obtenus par le test de DPPH et le test du CUPRAC sont $0,059 \pm 0,000$ mg/ml et $EC_{50} = 0,019 \pm 0,000$ mg/ml respectivement.

L'ensemble des résultats obtenu *in vitro* constitue une première étape dans la recherche de substance de source naturelle biologiquement active capable de traiter le diabète de type II afin de diminuer les effets insouhaitables des inhibiteurs de synthèse. Des essais complémentaires seront donc nécessaires pour caractériser les molécules responsables à ces activités et d'étudier leur effet *in vivo*, afin qu'elles puissent être utilisées thérapeutiquement.

Mots clés : α -amylase, α -glucosidase, activité antioxydante, *Salsola vermiculata*, diabète, isolement.

Abstract :

The present study was aimed to investigate *in vitro* the α -amylase and α -glucosidase inhibition and the antioxidant activities of eight isolated fractions of the hydromethanolic extract of *Salsola vermiculata L*.

Among the eight isolated subfractions, fraction 4 showed the highest α -amylase and α -glucosidase inhibitory potential with the IC_{50} values of 0.237 ± 0.004 mg/ml and α -glucosidase 0.057 ± 0.000 mg/ml respectively when compared to the reference inhibitor (acarbose).

The evaluation of the antioxidant activity shows that the same fraction was the most valuable one, exhibiting the highest antioxidant activity comparatively to vitamin C and vitamin E. The obtained EC_{50} values according to the DPPH and the CUPRAC assays were 0.059 ± 0.000 mg/ml and $EC_{50} = 0.019 \pm 0.000$ mg / ml respectively.

The *in vitro* obtained results in this work constitutes the first step in the search for new biologically active natural products able to threat type II diabete to diminishing the sides effects of synthetic inhibitors. Therefore, further experiments will be required to characterize the bioactive molecules and to study their *in vivo* effects, which they can be used therapeutically.

Keywords: α -amylase, α -glucosidase, antioxidant activity, *Salsola vermiculata*, diabete, isolation.

Sommaire

Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
ملخص	
Résumé	
Abstract	
I. Introduction générale	1
II. Matériels et méthodes	4
II.1. Matériel végétal et réactifs chimiques	4
II.2. Méthodes	5
II.2.1. Préparation et fractionnement des extraits	5
II.2.1.1. Préparation des extraits	5
II.2.1.2. Fractionnement des extraits	6
II.2.1.3. Analyse des fractions par UV et CLHP	9
II.2.2. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	10
II.2.2.1. Effet scavenger du radical DPPH	10
II.2.2.2. Réduction du cuivre (CUPRAC)	11
II.2.3. Evaluation de l'activité antidiabétique <i>in vitro</i>	11
II.2.3.1. Inhibition de l' α -amylase	12
II.2.3.2. Inhibition de l' α -glucosidase	12
III. Résultats et discussion	14
III.1. Fractionnement des extraits	14
III.2. Evaluation de l'activité antioxydante	16
III.3. Evaluation de l'activité antidiabétique	20
IV. Conclusion générale	27
V. Références Bibliographiques	28
VI. Annexe	30

I. Introduction générale

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés : les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante (**Sefi M et al., 2010**).

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes ...etc (**Salem J, 2009**). Cependant, l'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites fait l'objet de nombreuses recherches et amène à l'identification des principaux éléments actifs de la plante, les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques. Ainsi, l'industrie pharmaceutique s'appuie largement sur la diversité et les propriétés biologiques des métabolites secondaires végétaux pour le développement de nouveaux médicaments. Ils ont utilisé en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires (**Bahorun T, 1997**).

Le diabète sucré, est un trouble métabolique caractérisé par la présence d'une hyperglycémie attribuable à un défaut de la sécrétion d'insuline ou à l'action de l'insuline, ou des deux. L'hyperglycémie chronique liée au diabète est associée à des complications microvasculaires à long terme assez spécifiques touchant les yeux, les reins et les nerfs, ainsi qu'à un risque accru de maladie cardiovasculaire. Il est diagnostiqué par des symptômes tels que la chaleur interne du corps qui se traduit par l'émission d'un volume élevé d'urine, la faiblesse du corps, perte de poids...etc (**Goldenberg R et Punthakee Z, 2013**).

Le comité international d'experts a présenté une nouvelle classification origine des diabètes sucrés, cette classification est actualisée en fonction des données scientifiques récentes. On distingue deux types majoritaires : le diabète de type 1 consécutif d'une sécrétion insuffisante d'insuline (diabète insulino-dépendant, ou type 1) et le diabète de type 2 résultant d'une carence ou mauvaise utilisation de l'insuline (diabète non insulino-dépendant, ou type 2). De plus, il existe d'autres types minoritaires (le diabète gestationnel) et autres types spécifiques (anomalie génétique de la fonction des cellules β -pancréatiques, anomalie génétique de l'action de l'insuline, maladie du pancréas exocrine, diabète au cours des endocrinopathies, diabètes induits par des médicaments) (**Goldenberg R et Punthakee Z, 2013**).

Toutefois, le diabète sucré est une maladie grave, qui frappe à tout âge, partout dans le monde. En 1985, on estimait qu'un diagnostic de diabète avait été posé chez environ 30 millions de personnes dans le monde ; en 2000, ce nombre était passé à plus de 150 millions. En 2012, la fédération internationale du diabète (FID) a estimé que 371 millions de personnes étaient atteintes de diabète et on prévoit atteindre les 552 millions (soit un adulte sur 10) d'ici 2030, ce qui correspond à l'apparition de trois nouveaux cas par seconde (**Alice YY, 2013**).

L'Algérie n'est pas épargnée par cette épidémie qui interpelle le corps de la santé pour un redéploiement des moyens tournés vers ces pathologies chroniques non transmissibles. En effet, en Algérie, les études concernant ce fléau social sont encore peu nombreuses bien qu'elle est classée parmi les pays d'Afrique du nord les plus touchés par cette pathologie (**Ouhada F, 2012**). Cependant, la maladie continue d'augmenter d'une manière particulièrement accélérée, en particulier dans certaines régions défavorisées du pays. Le nombre des diabétiques est passé d'un million de personnes en 1993, à plus de 2.5 en 2007 soit une prévalence de 7.3 % et à plus de 3 millions de personnes en 2011 soit 7,4 % de la population algérienne avec une prévision qui atteindra 8.9 % en 2025 et plus de 9,3 % en 2030 (**Ouhada F, 2012**). Devant cette situation on note une absence de laboratoires pharmaceutiques et d'associations de malades atteints du diabète pour le dépistage de cette "catastrophe sanitaire", sachant que 10 % de la population algérienne ne sait pas qu'elle est diabétique.

Le traitement actuel du diabète sucré vise à soigner et non à guérir la maladie ce qui représente un échec des traitements pharmaceutiques conventionnels, surtout dans le cas des maladies chroniques. De ce fait, et malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne, les plantes médicinales trouvent encore leurs indications thérapeutiques dans le traitement d'une multitude d'affections et de maladies dans les différentes sociétés et cultures, y compris dans les pays développés (**De Smet PA et al., 2002 ; Eisenberg MD et al., 1993**). Dans 81% des cas, les indications traditionnelles de plantes antidiabétiques ont été expérimentalement confirmées (**Marles RJ et Farnsworth NR, 1995**).

Les médicaments antidiabétiques actuellement disponibles, contrôlent les niveaux de glucose sanguin sous la gamme normale et ceci en complétant l'insuline, en améliorant la sensibilité d'insuline, en augmentant la sécrétion d'insuline par le pancréas et en diminuant l'absorption du glucose au niveau intestinale (**Prabhakar PK et Doble M, 2011**). Ainsi, le but de tout traitement antidiabétique est d'atteindre un taux de sucre dans le sang ne dépassant pas 1,6 à 1,8 g/l, pour le

diabète de type 1, le traitement est strictement par l'administration d'insuline. Tandis que le traitement essentiel du diabète de type 2 se résume à l'application stricte d'un régime alimentaire associé à l'exercice physique permettant principalement de retrouver un poids normal. S'ils ne sont pas suffisants pour rétablir l'équilibre glycémique, il existe des médicaments hypoglycémisants actifs par voie orale c'est les antidiabétiques oraux, qui sont classés selon leur mode d'action en trois principales catégories, les sulfamides hypoglycémisants, les biguanides et les inhibiteurs des α -glucosidases qui diffèrent par leur mode d'action ainsi que la cible physiopathologique (Cheng YY et Josse RG, 2004).

Les inhibiteurs des α -glucosidases, atténuent la glycémie postprandiale par leur action directe comme agent inhibiteur des α -glucosidases ou α -amylases intestinales en ralentissant la digestion des polysaccharides donc retarder la libération et l'absorption du D-glucose, et aboutissent à une baisse de glucose sanguin. Ceci s'est avérée être l'une des meilleures stratégies pour diminuer l'élévation de la glycémie postprandiale chez le diabétique afin d'éviter les complications dégénératives du diabète (Cheng YY et Josse RG, 2004).

En Algérie, la médecine traditionnelle encore largement utilisée, constitue un patrimoine à conserver. Plusieurs plantes ou mélanges de plantes sont utilisées dans cette région, et nombreuses d'entre elles sont considérées traditionnellement comme antidiabétique. Selon les résultats publiés sur *Salsola vermiculata* pratiquement pas de travail qui s'intéresse à l'effet de leurs extraits sur l'activité de l' α -amylase et α -glucosidase.

C'est dans cette optique que se situe notre travail de mémoire qui s'attèle à l'étude antidiabétique *in vitro* de *Salsola vermiculata* poussant à l'état spontané dans la région de Laghouat. Le programme de recherche s'articule autour de trois axes principaux. Le premier axe porte sur le fractionnement de l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne de cette plante. Le second axe sera concentré sur l'évaluation de l'activité antioxydante des fractions obtenues par la meure *in vitro* de leur capacité de moduler le système redox, en évaluant la réduction du cuivre (test du CUPRAC) et leur pouvoir du piégeage du radical libre DPPH. Tandis que, le troisième axe sera focalisé sur l'examen de l'activité antidiabétique de ces fractions par la meure *in vitro* de leur pouvoir inhibiteur de l' α -amylase et α -glucosidase.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal et réactifs chimiques

II.1.1. Matériel végétal

La plante est récoltée dans la région de Sidi Makhlouf à 40 km du centre-ville de la willaya de Laghouat au mois d'Octobre 2012. La plante investiguée est séchée à l'abri de la lumière pendant 1 mois, et à température ambiante. Après, le matériel végétal est finement broyé pour l'extraction.

Nom arabe : الروقل

Nom français : Soude vermiculée

Classification :

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Tracheophyta*

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Caryophyllales

Famille : *Amaranthaceae*

Genre : *Salsola*

Étymologie :

- ***Salsola*** : Plante des terrains salés. De « *sal* » : sel et « *solum* » : le sol.
- ***vermiculata*** : Le fruit à la forme d'un ver enroulé sur lui même, comme une chenille.

Floraison : Octobre-Novembre.

Habitat : Lieux secs et un peu salés.
Commun partout.

Description :

Arbrisseau à tiges dressées ou décombantes, très rameuses. Feuilles linéaires, élargies à la base, généralement pubescentes ou velues, d'un vert pâle ou jaunâtre, les florales subulées ou vermiculaires, souvent glabres ; fleurs solitaires, en grappes étroitement paniculées ; ailes calicinales grandes, mais bien moins que dans l'espèce précédente, généralement pâles (**Figure 1**) (**Pegano H, 1958**).



Figure 1 : Photographie de *Salsola vermiculata* L.

II.1.2. Standard et réactifs chimiques

Tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Réactifs utilisés dans ce travail

Produit	Firme
CCM analytique ; iode	Fluka
Na ₂ CO ₃ , Glycine	Pearce
CuCl ₂	Riedel de Haën
Ethanol absolute, l' α -amylase, l' α -glucosidase, la néocuproïne, l'acarbose, le Sulfate de sodium anhydre, acétate d'ammuim, methanol, Acide formique 99%, CuSO ₄ .	Sigma- Aldrich
Gel de silice, éther de pétrole, acétate d'éthyle, butanol, chlorure de soduim,	Prolabo
Réactif du glucose oxydase	Biosystems

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation et fractionnement des extraits

II.2.1.1. Préparation des extraits

Après avoir broyé finement la partie aérienne de la plante une masse d'environ 230g a été extraite par Soxhlet en utilisant l'éther de pétrole comme solvant afin de la débarrasser des lipides et de la chlorophylle jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première.

Ensuite, le marc épuisé (environ 224 g de la poudre végétale) a été macéré plusieurs fois jusqu'à épuisement total dans 1000 ml d'un mélange hydrométhanolique (3/7) (V/V) à l'obscurité et à température ambiante durant 48h.

Le méthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite à 45°C à l'aide d'un Rotavapeur et l'extrait brut ainsi obtenu est subit ensuite à une extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle

puis le butanol respectivement. Les fractions organiques obtenus sont séchées en utilisant le sulfate de sodium anhydre, puis évaporés sous pression réduite à 45°C à l'aide d'un Rotavapeur. Les résidus obtenus sont pesés et conservés à 4°C jusqu'à leur fractionnement.

II.2.1.2. Fractionnement des extraits

Le fractionnement des deux extraits bruts obtenus (butanolique et acétate d'éthyle) a été réalisé par chromatographie sur colonne ouverte (CC) et chromatographie préparative sur couche mince (CCM).

- **Extrait d'acétate d'éthyle** : Le traitement de l'extrait d'acétate d'éthyle débute tout d'abord par une série de trois colonnes ouvertes selon les conditions d'élution suivantes : Acétate d'éthyle, Acétate d'éthyle/Ethanol (5:5) et Ethanol/Eau (9:1). Les colonnes ouvertes ont été réalisées sur gel de silice (40-63 µm) Prolabo. La taille des colonnes, la masse de gel de silice ont été adaptés à la quantité et à la nature de l'échantillon à séparer. Le choix des conditions d'élution, le suivi des purifications et le regroupement des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM. L'échantillon a été déposé sur colonne après formation d'un amalgame par solubilisation dans méthanol. Au total 300 tubes à essai sont recueillis et regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique par CCM analytique. Cinq fractions (**Figure 2**) sont obtenues et sont analysés par CCM analytique indique une composition différente dans le système d'éluant Acétate d'éthyle / Ethanol / Acide Acétique (6:2:0,5). Après évaporation, les fractions qui ont présentés des rendements élevés ont subis ensuite un deuxième fractionnement par une CCM préparative. Cette CCM a été réalisée avec une plaque de silice Fluka 20 cm x 20 cm x 250 µm, 60 Å. On dépose avec une pipette pasteur environ 0,6 ml de la solution concentrée (fraction dissoute dans le méthanol), puis la plaque doit être activée par chauffage dans une étuve à 60°C pendant 2 heures. Par la suite, on laisse développer dans une cuve saturée en éluant (Acétate d'éthyle / Ethanol / Acide Acétique (6:2:0,5)). Ensuite, après visualisation des spots sous UV à 254 et/ou 365nm dans une chambre noire, les taches obtenues sont grattées sur la plaque et les composés sont désorbés avec du méthanol, filtrés puis évaporés à sec pour obtenir quatre fractions : Fraction 1 (Rf = 0), Fraction 2 (Rf = 0,63), Fraction 3 (Rf = 0,71) et Fraction 4 (Rf = 0,88) (**Figure 3**).



Figure 2 : Photo de la plaque CCM analytique des cinq fractions après le regroupement.

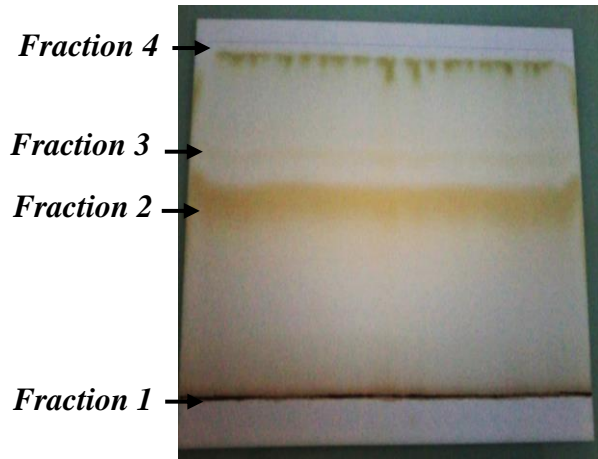


Figure 3 : Photo de la plaque CCM préparative de l'extrait d'acétate d'éthyle.

- **Extrait butanolique :** L'extrait butanolique sec a été subi au préalable une solubilisation dans l'eau distillée, puis une séparation par centrifugation. On obtient alors, le culot blanche jaunâtre (Fraction 5). Le surnageant restante a été ensuite lavée par l'acétate d'éthyle jusqu'à l'épuisement total. Deux partitions aont été récupérées, la phase aqueuse (Fraction 6) et la phase organique. La sous fraction organique a subi ensuite une chromatographie sur couche mince préparative (comme est décrit précédemment), dans le système d'éluant Acétate d'éthyle / Ethanol / Acide Acétique (5:5:1) (**Figure 4**) conduisant ainsi à l'isolement de deux composés (Fractions 7 : $R_f = 0,65$ et Fraction 8 : $R_f = 0,84$).

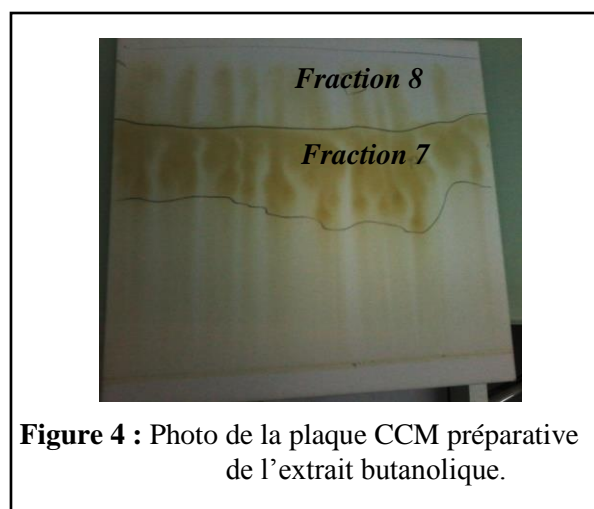


Figure 4 : Photo de la plaque CCM préparative de l'extrait butanolique.

On peut schématiser les différentes étapes de l'extraction et du fractionnement dans l'organigramme ci-après (**Figure 5**).

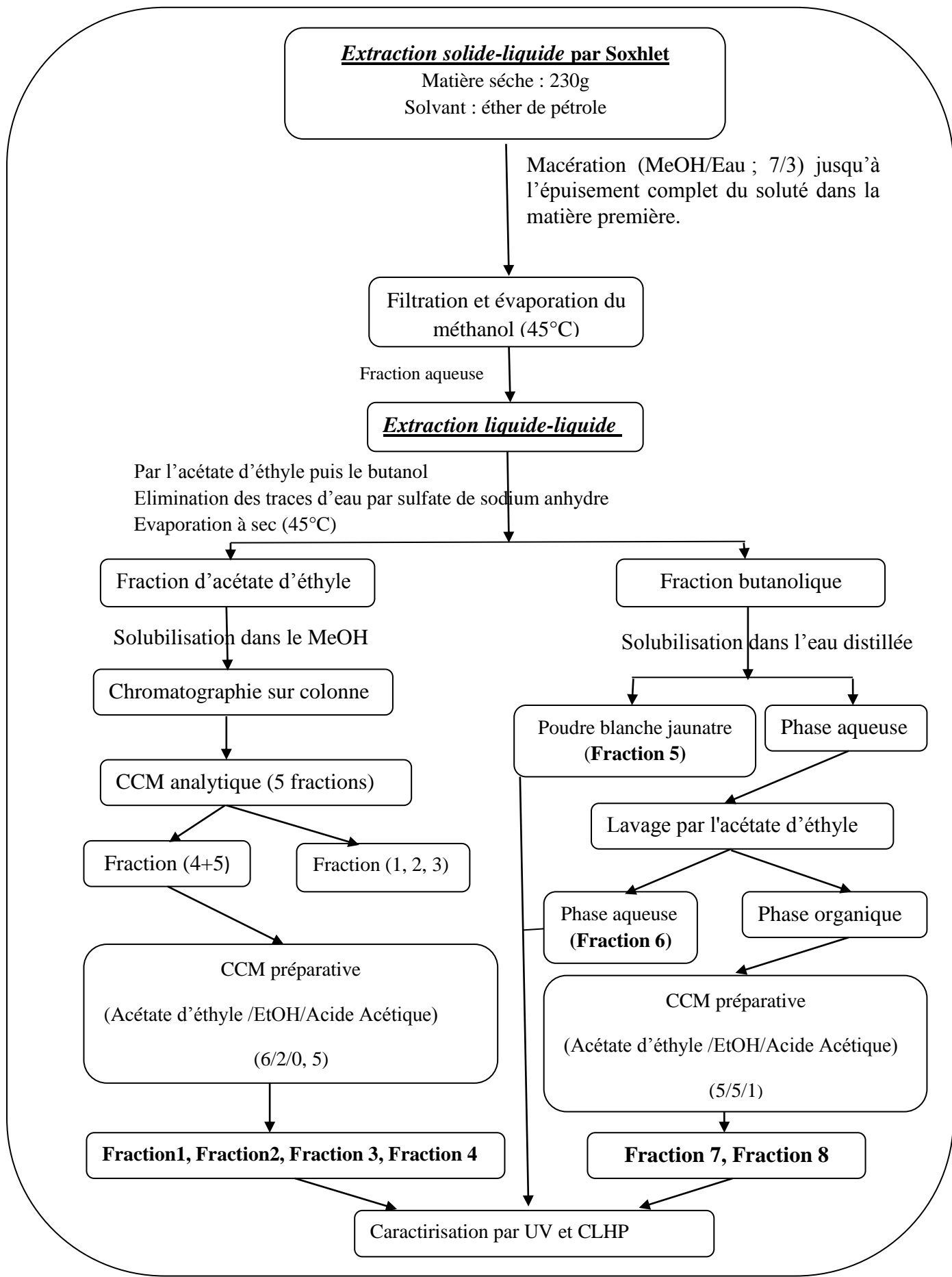


Figure 5 : Schéma récapitulatif de préparation des fractions (1-8)

II.2.1.3. Analyse des fractions par UV et CLHP

Les spectres UV fractions isolées ont été enregistrés sur un appareil UV-Visible de type 1800 UV-Visible Shimadzu.

Les analyses des CLHP ont été réalisées au sein du laboratoire d'ENS Laghouat. Ces analyses des fractions isolées ont été effectuées à l'aide d'une chaîne chromatographique LC-2030C SHIMADZU Prominence-i composée d'une pompe d'injection LC-20AD×2 units équipées d'une boucle d'injection de 40 µL, d'un Autosampler SIL-20AC, d'une une colonne chromatographique de type Nucleosil RP-18 (100 x 4,6 mm i.d; MACHEREY-NAGEL) et un détecteur UV-visible SPD-20AV réglé sur la longueur d'onde d'absorption maximale du composé étudié. Ce système est relié à une unité d'acquisition et traitement des données à l'aide du logiciel d'analyse Labsolutions.

Les échantillons sont séparés à 27,5°C en utilisant un gradient d'élution binaire méthanol (Solvant B) et eau bidistillée (Solvant A) avec un débit de 0,8 ml/ minute. Les spectres UV des composés analysés sont enregistrés à 254 nm. Dans ce travail, nous avons utilisé deux modes d'élution selon le type de la fraction analysée.

- Pour les fractions 1,2 et 3, la colonne a été tout d'abord conditionnée avec 100% du solvant A durant 3 minutes, puis une augmentation linéaire de B à 10 minutes jusqu'à 70%. Ensuite, une nouvelle augmentation linéaire jusqu'à 90% de B à 15 minutes, suivi par une autre augmentation de B pendant 5 minutes jusqu'à 100%. Ce mode d'élution reste constant jusqu'à 24 minutes où la colonne est équilibrée en 5 minutes aux conditions initiales.
- Pour les fractions de 4 à 8, le mode d'élution est comme suit : la colonne a été tout d'abord conditionnée avec 100% du solvant A durant 1 minute, puis une augmentation linéaire de B à 13 minutes jusqu'à 100%. Ce mode d'élution reste constant jusqu'à 17 minutes suivi par une diminution linéaire de B à 20 minutes jusqu'à 0%, où la colonne est équilibrée en 5 minutes aux conditions initiales.

II.2.2. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

L'activité antioxydante est définie comme étant la capacité d'un système à piéger des radicaux libres ou à réguler le système redox, défendant ainsi l'organisme contre la dégradation oxydative. Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude nous avons utilisé deux tests chimiques *in vitro* à savoir : le test de DPPH et le test de CUPRAC.

Les mesures de densités optiques en présence de chaque solution d'extrait à différentes dilutions nous ont permis d'exprimer le pouvoir antioxydant par le paramètre EC₅₀ qui représente la concentration de l'antioxydant nécessaire pour balayer 50% de radicaux libre totaux le test de DPPH et de réduire 50% des ions cuivrique totaux pour le test du CUPRAC.

Les valeurs des EC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes représentant la variation des pourcentages d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations des fractions testées. Nous avons également testé, la vitamine C, la vitamine E, le β-Carotène, l'acide gallique et la rutine comme antioxydants de référence.

II.2.2.1. Effet scavenger du radical DPPH

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différentes fractions, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (2,2 DiPhényle-1-Picryl-Hydrazyle) comme un radical libre relativement stable (Mansouri A., 2005). Dans ce test les antioxydants réduisent le radical DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune, le 2,2-diphénylpicryl-1-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno C., 2002). Brièvement, 0,5 ml des solutions de fractions ou standards sont ajoutés à 0,5 ml de DPPH (250 µM), puis le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif est mesurée à 517 nm sur un spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800). Le pouvoir antiradicalaire (PAR) est estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\text{PAR \%} = \frac{(\text{Abs}_t - \text{Abs}_{\text{éch}})}{\text{Abs}_t} \times 100$$

Où ; Abs_t représente l'absorbance en absence d'antioxydant (contrôle négatif) et Abs_{éch} indique l'absorbance en présence d'antioxydant (Fraction ou standard).

II.2.2. Réduction de cuivre (CUPRAC)

L'évaluation de la capacité réductrice de nos fractions a été effectuée à l'aide du test de CUPRAC. La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivie de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc)-ions cuivrique [Nc₂-Cu²⁺]. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-néocuproïne est réduit et cette réaction est quantifié spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 455 nm (Apak R, 2004).

Dans un tube à essai, 1 ml de tampon acétate d'ammonium (1 M, pH 7) est mélangé avec 100 µl de fraction à tester, 200 µl de Néocuproïne (7,5 mM) et 100 µl de CuCl₂ (0,01 M). Le mélange est incubé pendant 30 min à 37°C. Le complexe réduit [Cu²⁺-Nc] est quantifié spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 455 nm sur un spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800). L'effet antioxydant des différents composés testés a été exprimé en pouvoir réducteur (PR %) estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\text{PR \%} = [(\text{Abs}_t - \text{Abs}_{\text{éch}}) / \text{Abs}_t] \times 100$$

Où ; Abs_t est l'absorbance en absence d'antioxydant (contrôle négatif) et Abs_{éch} représente l'absorbance en présence d'antioxydant (Fraction ou standard).

II.2.3. Evaluation de l'activité antidiabétique *in vitro*

L'évaluation de l'activité antidiabétique *in vitro* des fractions isolées, a été réalisée dans le présent travail par l'étude de leur effet inhibiteur sur l'activité enzymatique de l'α-amylase et l'α-glucosidase. Cependant, les mesures de densités optiques en présence de chaque solution de la fraction isolée à différentes concentrations nous ont permis d'exprimer le pouvoir d'inhibition par le paramètre IC₅₀ qui représente la concentration de l'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse enzymatique jusqu'à 50 % de sa valeur maximale non-inhibée.

Les valeurs des IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. Nous avons également, testé l'acarbose comme inhibiteur de référence des deux enzymes.

II.2.3.1. Inhibition de l' α -amylase

Dans la présente étude on s'intéresse à l'évaluation des capacités des fractions isolés pour l'inhibition d'activité de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* (EC 3.2.1.1) en adoptant la méthode de **Dygart J et al., 1965**. L'activité enzymatique de cette enzyme est dosée sur l'amidon comme substrat. Elle catalyse l'hydrolyse de ce substrat qui libère le maltose et d'autres produits. Le maltose libéré est dosé spectrophotométriquement grâce à son pouvoir réducteur. Il réagit avec une solution basique de la glycine-cuivrique, en développant une coloration jaune-orangé en présence de la néocuproïne. Cette coloration est mesurable à 455 nm et son intensité est proportionnelle à la quantité du produit libéré.

Dans des tubes à essai, on a introduit 100 μ l d'amidon, 100 μ l de chaque fraction à différentes concentrations et 200 μ l du tampon phosphate salé. Après 10 minutes d'incubation à 37°C, 100 μ l de la solution enzymatique (10 UI/ml) est ajoutée. La réaction est stoppée après 2 minutes en ajoutant 1ml de la solution cuivrique A ((la glycine (0,21 M), Na₂CO₃ (0,38 M) et le CuSO₄ (1,8 mM)) et 1ml de la solution B ((Néocuproïne (4.9 mM)). Ensuite, le mélange est porté à l'ébullition pendant 10 min. Après l'ajout de 3 ml d'eau distillée, la lecture de la densité optique à 455nm a été effectuée immédiatement sur un spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800). Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la relation suivante :

$$PI = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Avec ;

PI : Pourcentage d'inhibition,

A₀ : Absorbance en absence de fraction (témoin),

A₁ : Absorbance en présence de fraction

II.2.3.2. Inhibition de l' α -glucosidase

Dans la présente étude on s'intéresse à l'évaluation de l'effet inhibiteur des fractions isolées vis-à-vis l'activité de l' α -glucosidase de la levure *Saccaromyces cerevisiae* EC (3.2.1.48). L'activité enzymatique de cette enzyme est dosée sur le saccharose comme substrat. Elle catalyse l'hydrolyse de ce substrat pour libérer le fructose et le glucose. Ce dernier peut être dosé spectrophotométriquement grâce à la séquence glucose oxydase-peroxydase-chromogène selon la réaction suivante :

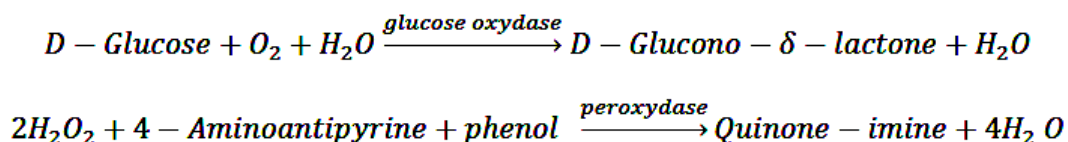


Figure 1 : Mécanisme enzymatique de dosage du glucose

Il s'agit d'un dosage colorimétrique à la suite de deux réactions enzymatiques couplées. La première réaction enzymatique étroitement spécifique (glucose-oxydase) oxyde le glucose présent dans l'échantillon en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier sert de substrat à la peroxydase dans une réaction couplée conduisant à l'oxydation de l'aminopyrine (Chromogène) en un produit coloré (La quinonéimine) qui peut être dosé spectrophotométriquement à 506 nm (Jemmali M et Kabana R, 1972 ; Ngo T et Lenhoff H, 1980).

100µl de chaque fraction isolée à différentes concentrations, 400µl du tampon et 400µl de la solution du saccharose ont été pré-incubés dans un bain marie à 37°C pendant 10 min. Ensuite, la réaction enzymatique a été déclenchée par l'ajout de 100µl de l'α-glucosidase (2UI/ml) et le milieu réactionnel a été incubé à 37°C pendant 15 min. Un chauffage à l'ébullition pendant 10min a été effectué pour stopper la réaction enzymatique. Après refroidissement, 1ml du réactif du glucose oxydase a été ajoutée. La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée après 30min d'incubation à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800) à une longueur d'onde de 506 nm contre un blanc. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la relation suivante :

$$PI = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Avec ;

PI : Pourcentage d'inhibition,

A₀ : Absorbance en absence de fraction (témoin),

A₁ : Absorbance en présence de fraction

III. Résultats et discussion

III.1. Fractionnement des extraits

Les travaux de chromatographie ont conduit à l'isolation de huit fractions partiellement purifiées. Les quatre premières viennent de l'extrait acétate d'éthyle et les quatre autres sont issues de l'extrait butanolique.

Les rendements d'extraction obtenus avec le butanol sont supérieurs à ceux obtenus avec le l'acétate d'éthyle. Il a donc été possible de disposer d'une quantité suffisante de cet extrait pour entreprendre un fractionnement guidé par la bioactivité.

La première chromatographie sur colonne effectuée sur l'extrait d'acétate d'éthyle, telle que décrite à la section (II.2.1.2) a permis d'obtenir plusieurs fractions dont deux fractions particulièrement intéressantes pour un fractionnement subséquent car elles présentent un rendement élevé et une composition chimique simple (par CCM). Or, les analyses par CCM de ces deux fractions par plusieurs conditions d'élution ont été mises à l'essai pour obtenir une meilleure séparation, montrent la présence de quatre taches chromatographiques (**Figure 3**). La purification des quatre composés a été effectuée par chromatographie sur couche mince préparative qui a permis d'obtenir les sous-fractions (1-4).

Cependant, le fractionnement réalisé sur l'extrait butanolique a donné également quatre fractions (5-8). Les fractions 5 et 6 sont obtenues par séparation liquide-liquide, tandis que les deux autres fractions (7 et 8) sont issues d'une purification par CCM préparative (**Figure 4**).

La pureté des fractions obtenus a été ensuite contrôlée par l'étude de leur profils CLHP (**Figures 18-25 ; voir annexe**). Le bilan massique ainsi que les profils CLHP des 8 fractions ainsi obtenues, sont présentés dans le **Tableau 2**.

Le fractionnement par les méthodes chromatographiques classiques nous a permis d'obtenir ainsi en une étape des fractions chimiquement très simplifiées, contenant pour la plupart un composé de façon prépondérante, en particulier les fractions 2, 4, 5 et 7 (**voir composition Tableau 2**). Les spectres UV pour ces fractions majoritaires (**Figures 10-17 ; voir annexe**) montrent des maximas d'absorption vers 260, 280 et/ou 360 nm, compatibles avec des structures de type chromone ou coumarine.

Tableau 2 : Bilan massique et composition CLHP (254nm) des 8 fractions isolées

	Aspect	Couleur	Masse (mg)	Composition CLHP des pics majoritaires	
				Temps de rétention (min)	Pourcentage en Aire (%)
Fraction 1	Visqueux	Marron	386,5	2,00	16,00
				10,00	18,43
				15,00	56,81
Fraction 2	Visqueux	Jaune claire	84	11,50	80,93
				15,00	19,07
Fraction 3	Visqueux	Vert olive	95,8	2,00	12,51
				11,50	46,60
				15,00	30,90
Fraction 4	Poudre	Marron	139,6	13,60	74,30
Fraction 5	Visqueux	Marron	223,9	2,00	28,60
				13,60	71,40
Fraction 6	Poudre	Blanc jaune	679,4	13,80	56,25
Fraction 7	Visqueux	Jaune foncé	103,1	11,00	72,10
				13,80	20,15
Fraction 8	Visqueux	Marron	2159,5	2,00	34,40
				11,00	16,40
				13,80	46,00

Cependant, jusqu'à ce jour, cette espèce n'a fait l'objet que de très peu d'études phytochimiques. Elle a été étudiée seulement pour sa composition en huiles essentielles et leurs activités antimicrobiennes (**Bouaziz M et al., 2009 ; Haddi M-L et al., 2009 ; Gannoun S, al., 2016**).

Toutefois, un certain nombre d'espèces du genre *Salsola* ont déjà été étudiées pour leurs compositions en quelques métabolites secondaires et leurs activités biologiques. Le salsolanol et biphenylsalsinol, ont été rapportés comme étant des composés bioactifs du genre *Salsola villosa Delile. ex Schul.* (**Oueslati M H, 2015**). Des dérivés de l'isorhamnetine ont été isolées du *Salsola imbricata Forssk* (**Osman SM et al., 2016**). Ainsi, cinq métabolites secondaires ont été purifiés de la partie aérienne de *Salsola baryosma* (**Ahmed S et al., 2006**).

III.2. Evaluation de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant ne peut être mesuré qu'indirectement à partir de ses effets. La plupart des méthodes de mesure de l'activité antioxydante sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition" dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, on effectue différents tests de mesure de pouvoir antioxydant. Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par quatre mécanismes : par transfert d'électron, par transfert d'atome d'hydrogène, par chélation des métaux ou par inhibition des enzymes oxydatives (**Bouzi W et al., 2011**).

De ce fait, l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits a été évaluée par deux méthodes différentes à savoir la méthode de réduction de cuivre (CUPRAC) et le test de DPPH. Les résultats obtenus à partir de ces deux tests sont exprimés par le paramètre EC₅₀. Plus cette valeur est faible, plus le composé est antioxydant. Alors, l'approche la plus simple dans l'interprétation des données, est de tracer le pourcentage antioxydant en fonction de la concentration de l'antioxydant, développant une gamme de concentrations qui donne des taux d'inhibition compris entre 20 et 80 % (**Figure 26 et 27 ; Voir annexe**). Le **Tableau 3** résume les différents résultats obtenus.

Le paramètre EC₅₀ a été présenté récemment pour l'interprétation des résultats de l'activité antioxydante (autrement appelé la valeur IC₅₀). Ceci est défini comme la concentration de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité. Ce paramètre a été présenté par Brand-Williams et ses collaborateurs (**Brand-Williams W., 1995 ; Bondet V., 1997**). Il a été employé plus tard par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (**Jian T., 2007**). L'inconvénient de ce paramètre est que plus l'activité antioxydante est élevée, plus la valeur d'EC₅₀ est inférieure. Les valeurs des EC₅₀ obtenus à travers ce screening antioxydant représentent la moyenne de deux essais réalisés en parallèle ± l'écart-type. Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence.

Tableau 3 : Valeurs d'EC₅₀ des fractions et standards mesurés par le test de DPPH et le test de CUPRAC

Fractions et standards	EC ₅₀ (mg/ml)	
	Test de DPPH	Test de CUPRAC
Fraction 1	0,340± 0,012	0,189± 0,000
Fraction 2	0,238± 0,004	0,091± 0,001
Fraction 3	0,339± 0,001	0,163± 0,003
Fraction 4	0,059± 0,000	0,019± 0,000
Fraction 5	2,905± 0,017	2,058± 0,022
Fraction 6	0,511± 0,005	0,259± 0,002
Fraction 7	0,144± 0,002	0,098± 0,000
Fraction 8	0,390±0,001	0,306±0,008
Vitamine C	0,005±0,000	0,058± 0,001
Vitamine E	0,010± 0,000	0,029± 0,000
β-Carotène	0,162±0,002	/
Acide gallique	0,002± 0,000	0,005± 0,000
Rutine	0,008± 0,000	0,013±0,000

Dans le test du DPPH, ce radical est généralement l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicalaire et la simplicité de l'analyse (Bozin B., 2008). A température ambiante, le radical DPPH présente une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance capable de saturer sa couche électronique. On peut donc détecter la diminution l'intensité de la coloration par spectrophotométrie. Cette réduction rend compte du pouvoir piègeur des molécules testées.

Le **Tableau 3** représente les résultats d'activité antiradicalaire obtenus par le test de DPPH pour toutes les fractions ainsi que les antioxydants de référence. Ces résultats montrent clairement que les antioxydants de référence, ont présenté des activités antiradicalaires supérieures à celle des fractions testées. Autrement, les résultats obtenus avec ce test montrent que la fraction 4 est de valeur d'EC₅₀ trop faible, (EC₅₀= 0,059± 0,000) ce qui traduit son excellent effet antiradicalaire par rapport à tous les fractions. Par contre, la fraction 5 a dévoilé une faible activité antiradicalaire.

De plus, les fractions obtenues via le fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Salsola vermiculata* présentent une activité antiradicalaire supérieure (entre 5,6 et 1 fois supérieur, EC₅₀ entre 0,059± 0,000 mg/ml et 0,511± 0,005 mg/ml) à l'activité montrée par l'extrait brut (EC₅₀= 0,328±0,011 mg/ml). Cependant, la fraction 4 présente une activité presque 3 fois supérieure de celle du β-Carotène. Les trois autres fractions montrent une faible capacité antiradicalaire **(Youssefi Z. 2016)**.

Outre, les fractions obtenues via le fractionnement de l'extrait butanolique de *Salsola vermiculata* présentent tous une activité antiradicalaire supérieure (entre 5,5 et 1,3 fois) à celle présentée par l'extrait brut (EC₅₀=0,652±0,013 mg/ml). En effet, la fraction 5 est moins active que l'extrait brut. Néanmoins, la fraction 7 une activité proche de celle du β-Carotène.

Par comparaison avec des fractions déjà isolées de *Tamus communis L.* dont leurs valeurs d'EC₅₀ sont supérieures à 1,25 mg/ml **(Zerargui F, 2015)**, il s'avère que toutes les fractions isolées dans notre travail (sauf la fraction 5) présentent une activité antiradicalaire très importante.

L'activité réductrice des fractions a été évaluée en utilisant la méthode de CUPRAC. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et les extraits organiques et aqueux **(Apak R., 2007)**. La présence des réducteurs dans les extraits de la plante provoque la réduction de Cu²⁺ a la forme cuivreuse. Par conséquent, Cu²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant la diminution de la densité de la couleur verte dans le milieu réactionnel à 455nm. En d'autres termes, le système CuCl₂/néocuproïne confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semiquantitative » des concentrations des fractions, qui participent à la réaction rédox. Les résultats de ce test sont résumés dans le **Tableau 3**.

Tout d'abord, il faut signaler que le pouvoir réducteur des fractions est dose dépendante (concentration dépendante). Ainsi, l'ensemble des extraits étudiés révèle des propriétés réductrices intéressantes ce qui se manifeste par de faibles valeurs de EC_{50} qui varient entre $0,019 \pm 0,000$ mg/ml et $2,058 \pm 0,022$ mg/ml. Parmi les huit fractions testées, la fraction 4 s'est avérée toujours la plus active avec un EC_{50} de l'ordre $0,019 \pm 0,000$ mg/l. Par contre, l'activité réductrice la plus faible a été affichée par la fraction 5. Une activité intermédiaire a été obtenue pour les autres fractions avec des valeurs d' EC_{50} de 5 à 108 fois moins actifs que la fraction 4.

En comparaison avec les antioxydants de référence, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs. Par contre, on remarque que la fraction 4 est 3 fois plus active que la vitamine C et 1,5 fois plus active que la vitamine E. En effet, selon le criblage chromatographique par CLHP des fractions, on constate que le bon effet réducteur peut être attribué au pic majoritaire qui apparaît à un temps de rétention de 14 minutes (**Figures 4, 5, 6 et 8**).

D'autre côté, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent l'existence d'une très bonne corrélation linéaire significative entre les pouvoirs antioxydants mesurés par les deux tests (DPPH et CUPRAC) ($R^2 = 0,995$) (**Figure 6**). Ce résultat suggère que les fractions qui ont fourni un pouvoir antiradicalaire important exposent un statut réducteur aussi fort. C'est-à-dire, les fractions ayant la capacité de piéger le radical DPPH, pourra être attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres (R^\bullet) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle.

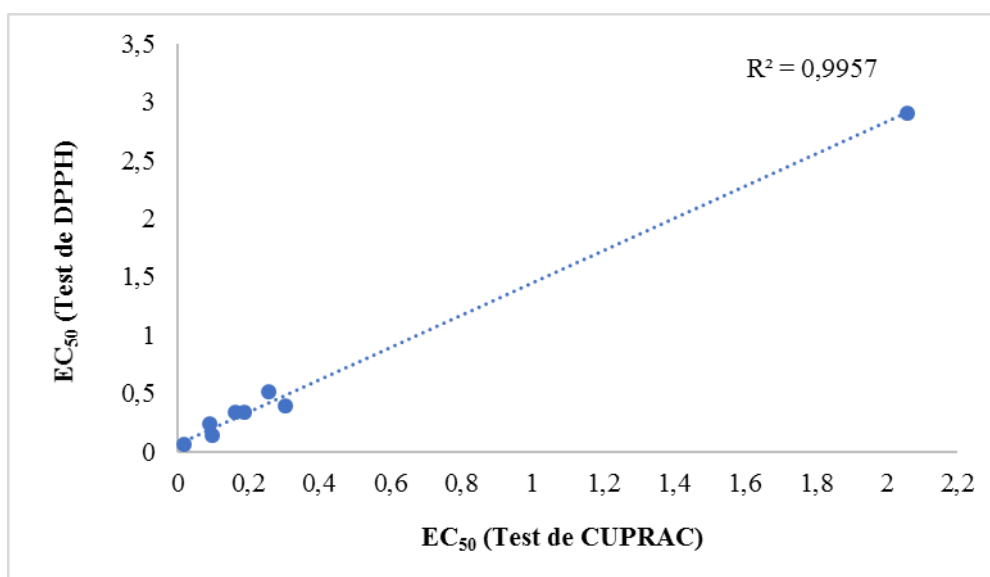


Figure 6 : Corrélation entre le test du DPPH et le test du CUPRAC

De plus, le pouvoir réducteur des fractions isolées est relativement supérieur par rapport à au pouvoir antiradicalaire. Ainsi, le pouvoir réducteur est probablement dû à la présence de molécules portant des groupements hydroxyles servir comme donneur d'électron. Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Bougandoura N et Bendimerad N, 2013**).

Selon la littérature, les composés phénoliques s'avèrent comme de bons agents antioxydants (**Bougandoura N et Bendimerad N, 2013**). Cependant, dans la présente étude les allures des spectres UV issus des fractions purifiées montrent que les fractions qui présentent une bande d'absorption à 280 nm se sont probablement des dérivés hydroxybenzoïques, tandis que, les dérivés hydroxycinnamiques absorbent autour de 320 nm. Par contre les composés ayant deux bandes d'absorption à 250–280 et 310–360 nm, sont des éventuellement des flavonoïdes. Alors, la mise en évidence des principes actifs dans les fractions préparées devra être approfondie afin de caractériser d'éventuelles nouveaux composés ou de trouver des molécules déjà connus qui pourront être utilisés pour des études chimiotaxonomiques.

III.3. Evaluation de l'activité antidiabétique

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'extrait de plantes est une pratique courante en médecine traditionnelle.

Pour mesurer la capacité inhibitrice des extraits sur l' α -amylase, nous avons utilisé le l'amidon comme substrat. La cinétique de l' α -amylase est basée sur la courbe d'étalonnage du maltose. A l'aide de cette courbe d'étalonnage, nous avons pu calculer les concentrations du maltose libéré lors de l'hydrolyse d'amidon (0,59 g/l) par l' α -amylase pendant un temps de réaction de 2 minutes (**Youssefi Z. 2016**).

Les valeurs des IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées (**Figures 28 et 29 ; Voir annexe**). Les résultats obtenus sont enregistrés dans le **Tableau 4**. Ils représentent la moyenne de deux essais réalisés en parallèle \pm l'écart-type.

Tableau 4 : Valeurs des IC₅₀ mesurées par les tests d'inhibition de l' α -amylase et l' α -glucosidase

Fraction et Standard	IC ₅₀ (mg/ml)	
	Test de l' α -amylase	Test de l' α -glucosidase
Fraction 1	0,541±0,006	0,144± 0,000
Fraction 2	0,210± 0,063	0,946± 0,001
Fraction 3	0,380± 0,032	0,147± 0,003
Fraction 4	0,237± 0,004	0,057± 0,000
Fraction 5	1,888± 0,127	0,260± 0,028
Fraction 6	0,480± 0,084	0,674± 0,033
Fraction 7	0,701± 0,026	0,619± 0,002
Fraction 8	0,537±0,010	0,349± 0,020
Acarbose	0,582± 0,000	0,077± 0,000

Les résultats obtenus montrent clairement que toutes les fractions inhibent l'activité de l' α -amylase significativement, sauf les deux fractions 5 et 7. Les valeurs calculées sont comprises entre 0,210±0,063 mg/ml et 1,888±0,127 mg/ml. En revanche, les deux fractions 2 et 4 ont montré une meilleure activité anti-amylasique par rapport à tous les autres fractions (IC₅₀ = 0,237±0,004 mg/ml et 0,210± 0,063 mg/ml respectivement).

D'autre part, on remarque que la fraction 2 et la fraction 4 renferment des valeurs IC₅₀ très voisines. Or, l'activité inhibitrice de la fraction 1 (IC₅₀ =0,541± 0,004 mg/ml) est moins efficace que celle de la fraction 8 (IC₅₀ =0,537± 0,010 mg/ml), et cette dernière est moins active que la fraction 6 (IC₅₀ =0,480± 0,084 mg/ml). Aussi la fraction 4 est plus efficace que la fraction 3 (IC₅₀ =0,380± 0,032 mg/ml). De plus, on constate que les fractions qui ont présentés des pics majoritaires dans leurs chromatogrammes CLHP, ont dévoilés des capacités anti- α -amylasique plus importantes.

Néanmoins, les résultats obtenus montrent que les fractions isolées de l'extrait d'acétate d'éthyle présentent des effets anti-amylasiques plus importants à celles issues de l'extrait butanolique. Ce résultat peut être expliquer par le fait que l'acétate d'éthyle a permis l'extraction de certains composés ayant éventuellement des groupements glycosidiques qui possèdent une affinité

importante vis-à-vis de notre enzyme et donc, la probabilité de rentrer en compétition avec le substrat au niveau de la fixation sur le site actif de l'enzyme.

Puisque l'acarbose est connu pour leurs propriétés inhibitrices puissantes de l' α -amylase (Dastjerdi ZM et al., 2015), il est donc utilisé comme contrôle positif. D'après les valeurs d'IC₅₀ obtenues, on constate que toutes les fractions testées découvrent des activités anti-amylasiques supérieures ou similaires à celles déterminées pour l'inhibiteur de référence (acarbose).

Afin de dévoiler la relation entre l'activité antiradicalaire mesurée par le test de DPPH et l'activité inhibitrice de l' α -amylase de fractions étudiées, nous avons tracé la courbe représentant la variation des valeurs d'IC₅₀ en fonction des valeurs d'EC₅₀ (Figure 7). A partir de ce tracé, on distingue l'existence d'une très bonne corrélation linéaire ($R^2 = 0,91$) qui suggère que l'activité antiradicalaire est un facteur important pour le bon processus d'inhibition de l' α -amylase, ainsi les fractions qui ont donné des capacités antiradicalaires importantes se sont également de bons inhibiteurs de cette enzyme.

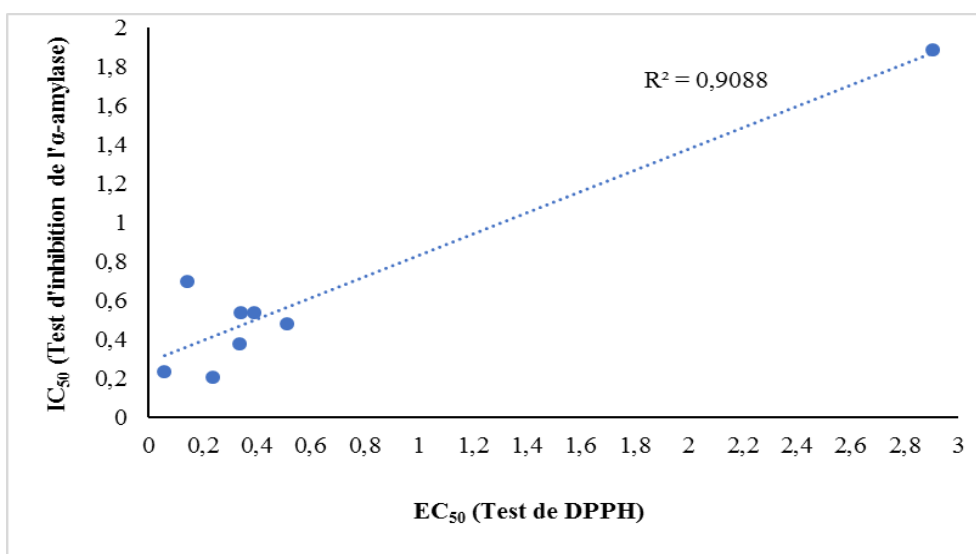


Figure 7 : Corrélation entre le test d'inhibition de l' α -amylase et le test du DPPH

Parallèlement et en vue de dévoiler la relation entre l'activité anti-amylasique et l'activité réductrice comme une autre étape de compréhension des facteurs responsables à l'inhibition de l' α -amylase, nous avons tracé la variation des valeurs d'IC₅₀ et les valeurs d'EC₅₀ mesurées par le test de CUPRAC pour les fractions étudiées (Figure 8).

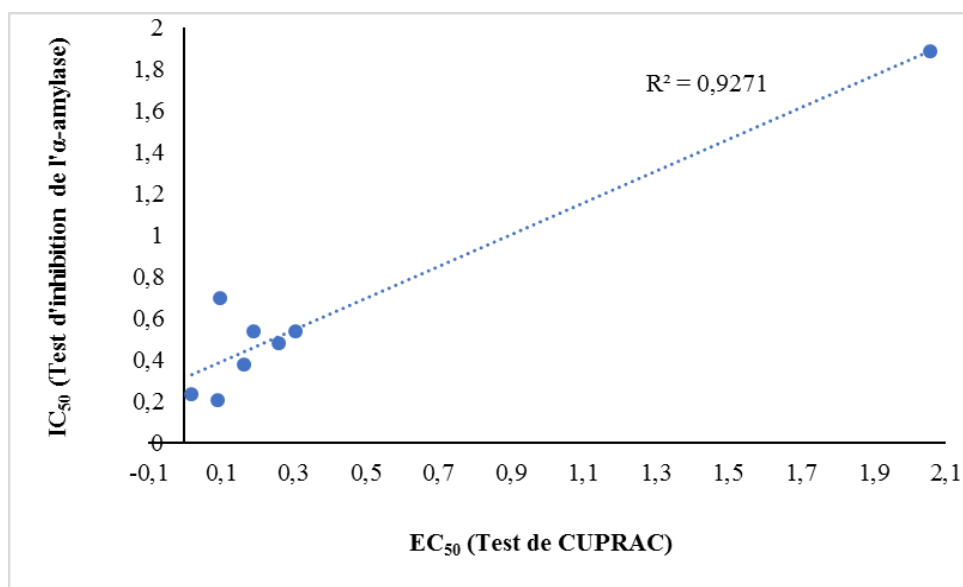


Figure 8 : Corrélation entre le test d'inhibition de l'α-amylase et le test du CUPRAC

D'après ci-dessus, il est évident que le pouvoir réducteur est un facteur important pour le bon processus d'inhibition de l'α-amylase. La courbe expose une corrélation linéaire très significative ($R^2 = 0,93$) toute les fractions. Plus la capacité réductrice est importante, plus le potentiel anti-amylasique est intéressante ; c'est-à-dire qu'il n'y a pas un effet significatif de la concentration sur l'activité que celle de la structure chimique des composés actifs.

Les inhibiteurs d'enzyme peuvent agir selon des mécanismes varies, en se combinant soit avec l'enzyme (compétitive avec le substrat ou incompétitive), soit avec le complexe enzyme substrat (non compétitive), soit avec le substrat lui-même. Or, l'activité enzymatique peut être affectée de façon spécifique par de nombreux agents chimiques et les drogues tels que l'acarbose qui a une forme proche de celle des oligosaccharides issus de la digestion de l'amidon. Il peut ainsi se lier aux sites de l'α-amylase pancréatique, inhibé puissamment, de façon compétitive et dose-dépendante (Dastjerdi ZM et al., 2015).

Nonobstant, certaines plantes ont une activité inhibitrice enzymatique inclue les composés polyphénoliques et glycoprotéiques (Boath D et al., 2012). Plusieurs de ces métabolites 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 L et al., 2004). En fonction de nos résultats obtenus sur l'inhibition de l'α-amylase, on suggère que *S. vermiculata*, peut présenter un effet bénéfique sur l'hyperglycémique poste prandial ou l'hyperglycémique des diabétiques.

L' α -glucosidase catalyse la réaction de dégradation du saccharose en glucose et fructose. Le dosage de l'activité enzymatique est fait en dosant le glucose libéré lors de cette réaction pendant 15 minutes. Pour cela, une courbe d'étalonnage du glucose a été préalablement établie. Nous avons pu calculer les concentrations du glucose libéré lors de l'hydrolyse du saccharose par l' α -glucosidase qui nous ont permis de tracer les courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibitions obtenus en fonction de la concentration de l'inhibiteur (**Voire annexe**). Ces tracés nous ont permis ensuite de calculer le paramètre IC_{50} de chaque fraction isolée. L'acarbose a été utilisé comme control positif. Les résultats ainsi obtenus sont enregistrés dans le **Tableau 4**.

Les résultats montrent que les valeurs IC_{50} étaient comprises entre $0,057 \pm 0,000$ mg/ml et $0,946 \pm 0,001$ mg/ml. Néanmoins, la fraction 4 s'est avérée la plus efficace par rapport aux autres fractions car il présente la valeur d' IC_{50} la plus faible ($0,057 \pm 0,000$ mg/ml). Mais, comparativement à l'inhibiteur de référence (Acarbose), on remarque que seule la fraction 4 a donné un pouvoir antiglycosidasique supérieurs à celui de l'acarbose. En revanche, les autres fractions ont présenté des capacités moyennement satisfaisantes d'inhiber l'activité de l' α -glucosidase.

La synthèse des différents résultats pour l'activité de nos fractions montre nettement que le pouvoir d'inhibition vis-à-vis de l' α -glucosidase est un caractère spécifique pour chaque fraction qui peut varier selon sa composition et sa richesse en molécules responsable à l'activité. Cependant, l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase des fractions n'est pas liée directement à la présence des agents antioxydants d'autant plus que la régression linéaire établit entre ces tests (DPPH, CUPRAC et α -glucosidase) a donné des corrélations faibles ($R^2 < 0,03$). En revanche, une corrélation positive ($R^2 = 0,45$) a été repérée entre les pouvoir antiglycosidasique des fractions et le pourcentage en aire du pic qui apparaît en fin des chromatogrammes (**Figure 9**). Ce résultat suggère que les fractions qui renferment un pourcentage important de ce pic exposent un statut antiglycosidasique aussi remarquable. Ainsi, on peut déduire que 45 % de l'activité inhibitrice de α -glucosidase est due à la contribution de ce pic.

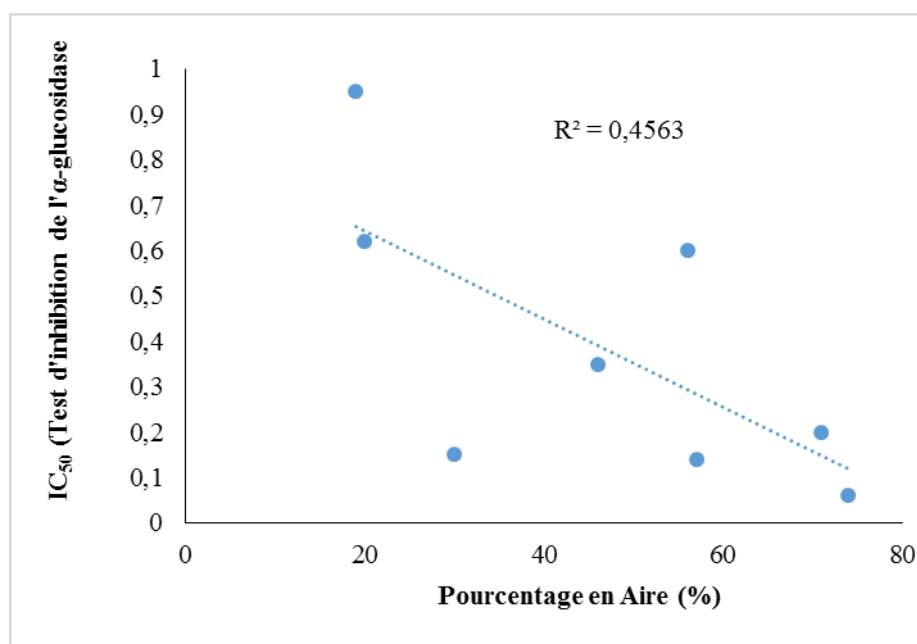


Figure 9 : Corrélation entre le test d'inhibition de l' α -glucosidase et le pourcentage en aire du pic qui apparaît à la fin des chromatogrammes

Généralement, les résultats d'inhibition enzymatique de l' α -amylase et l' α -glucosidase des essais d'inhibition sont très encourageants car la plupart des fractions ont la capacité d'inhiber les deux enzymes avec des facteurs d'efficacités différents. De plus, on a constaté que ces fractions sont de bons inhibiteurs de l' α -amylase que l' α -glucosidase.

Une propriété qui confère un avantage sur les drogues synthétiques comme l'acarbose, l'utilisation par les diabétiques dans la gestion de la glycémie postprandiale, qui inhibent fortement α -amylase. Inhibition plus forte de l'activité α -glucosidase et une inhibition modérée de l'activité d' α -amylase des extraits végétaux pourraient aborder l'inconvénient majeur de ce moment utilisé α -glucosidase et α -amylase médicaments inhibiteurs des effets secondaires tels que la distension abdominale, la flatulence, météorisme et, éventuellement, de la diarrhée (Kazeem M et al., 2013).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats obtenu *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substance de source naturelle biologiquement active capable d'inhiber efficacement l'activité amylasique et glucosidasique et les radicaux libres. Des essais complémentaires seront donc nécessaires pour caractériser les molécules responsables à ces activités, afin qu'elles puissent être utilisées pour de diverses études pharmacologiques.

Outre, les complications du diabète sont fortement liées à certain nombre de facteurs. A côté de l'hyperglycémie chronique et la glycation non enzymatique des protéines, un facteur très important impliqué dans la genèse de ces complications est le stress oxydatif. En effet, le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités d'espèces oxygénées activées (ROS) dont font partie les radicaux libre (le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet). Le patient diabétique présente une surproduction des ROS d'une part et d'autre part, une diminution des antioxydants, ce qui génère un état de stress oxydatif à l'origine des microangiopathies et des macroangiopathies (Auberval N, 2010). Ainsi, les travaux doivent cibler le stress oxydant comme un des éléments en cause dans les altérations mitochondriales en situation de diabète, suggérant que l'utilisation de stratégies basées sur les antioxydants pourrait constituer un traitement complémentaire aux thérapies conventionnelles.

De ce fait, les résultats obtenus à travers cette étude laissent un grand espoir pour l'avenir avec le rôle protecteur que peuvent conférer l'*Salsola vermiculata L* dans la prévention et la limitation des effets toxiques des radicaux libres et le traitement du diabète non insulino-dépendant. En effet, il ressort du présent travail que la fraction 4 est un produit fort intéressant et riche en possibilités thérapeutiques. Nos résultats sont pour nous remarquables car ils ouvrent dans le futur des perspectives expérimentales qui devraient nous permettre d'identifier clairement les molécules impliquées dans l'effet hypoglycémique et antioxydant de *Salsola vermiculata L* et d'avancer vers une meilleure connaissance du (des) mécanisme(s) moléculaire(s) intervenant dans les effets pharmacologiques observés.

IV. Conclusion générale

La toxicité et/ou les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse rend l'utilisation des plantes qui contiennent des composés bioactifs en progression constante. En effet, l'effet hypoglycémiant des plantes médicinales et des métabolites qui les composent avaient déjà fait l'objet de différentes études.

De ce fait, ce travail avait pour but d'évaluer *in vitro* les activités antidiabétiques et antioxydantes des huit fractions obtenues de l'extrait hydrométhanolique d'une espèce de la famille de *Chenopodiaceae* ; *Salsola vermiculata* L. le choix de cette espèce est basé sur une enquête bibliographique qui a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique.

A la lumière des résultats achevés *in vitro*, huit fractions isolées de l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne de *Salsola vermiculata* L sont doué d'une activité antioxydante intéressante et une activité antidiabétique remarquable. Mais comparativement aux standards utilisés, seule la fraction 4 a exposé un statut antioxydant et antidiabétique très intéressant. Cela, pourra justifie son utilisation empirique et constitue un réel avantage à sa vulgarisation comme médicament non seulement contre le diabète et les perturbations y associées, mais aussi contre le stress oxydant.

Ces résultats restent préliminaires ce qui nécessite d'autres études approfondies pour mieux se concentrer sur les effets révélés. Des études à l'échelle moléculaire sont nécessaires pour déterminer, d'une part les composés actifs de cette espèce qui peuvent être responsables de tels effets et d'autre part, le mécanisme absolu par lequel ces composées accomplissent leurs rôles. En outre, des travaux *in vivo* supplémentaires devront être menés pour valider les résultats trouvés *in vitro*.

V. Références bibliographiques

Ahmed S., Maharvi GM., Ashraf M., Riaz N., Afza N., Khan KM., Khan MS., Jabbar A., Janbaz KH. Phytochemical studies on *Salsola baryosma*. Journal- Chemical Society of Pakistan, 2006, 28(2) 176-178.

Alice Y. Y., Cheng M.D. Introduction (Comité d'experts des Lignes directrices de pratique clinique de l'Association canadienne du diabète). Canadian Journal of Diabète, 2013, 37, S361-S364.

Apak R., Güçlü K., özurek M., Karademire S. Novel total Antioxidant Capacity Index for Dietary polyphenols and vitamins C and E, using their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine; CUPRAC Methode. Journal of Agricultural and food chemistry, 2004, 52 (26), 7970-7981.

Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Esin çelik S., Bektaşoğlu B., Işıl Berker K., Özyurt D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. Molecules, 2007, 12 (7), 1496-1547.

Auberval N. Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. Thèse de doctorat en sciences, Université de Strasbourg, 2010.

Bahorun T. Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural research council, 1997, 83-93.

Boath D., Grussu D., Stewart., McDougall Berry G J. Polyphenols Inhibit Digestive Enzymes: a Source of Potential Health Benefits? Food Dig, 2012, 3, 1-7.

Bondet V., Brand-Williams W. and Berset C. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH Free radical method. Lebensmittel –Wissenschaft und Technologie, 1997, 30 (6), 609-615

Bouaziz M., Dhouib A., Loukil S., Boukhris M., Sayadi S. Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. African Journal of Biotechnology, 2009, 8 (24), 7017-7027.

Bougandoura N., Bendimerad N. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 2013, 14-19.

Bouid W., Yahiaï M., Abdeddaim M., Aberkane M.C., Ayachi A. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne. Leban. Scien. J, 12, 1-8

Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran R., Igic I. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), Food Chemistry, 2008, 111 (4), 925-929.

Brand-Williams W., Cuvelier M E., Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensmittel –Wissenschaft Technologie, 1995, 28 (1), 25-30.

Cheng Y Y., Josse R G. Les inhibiteurs de l'absorption intestinale dans la prévention et le traitement du diabète de type 2, Endocrinologie-Conférences Scientifique, 2004, 4.

Dastjerdi Z M., Namjoyan F., Azemi ME. Alpha Amylase Inhibition Activity of Some Plants Extract of *Teucrium* Species. European Journal of Biological Sciences, 2015, 7 (1), 26-31.

De Smet PA. Herbal remedies. N Engl J Med, 2002, 347(25), 2046-2057.

Dygart J., Li L H., Florida K., Thoma JA. Determination of reducing sugars with improved precision. Anal Biochem, 1965, 13, 367-374.

Eisenberg DM, Kessler RC, Foster C, et Norlack FF, Calkins, D et Delbanco L. Unconventional medicine in the United States. N Engl J Med, 1993, 328, 246-252.

Goldenberg R., Punthakee Z., Definition, classification et diagnostic du diabète, du prédiabète et du

syndrome métabolique. Canadian Journal of Diabète, 2013, 37, S369-S372.

Jemmali M., Kabana R. Dosage rapide oxygraphique du glucose en présence de glucose-oxydase dans les milieux complexes, Annales de biologie animale, biochimie, biophysique, 1972, 12 (2), 329-334.

Jian T., Qinxue H., Jing Y., Rurun L., Xiuyi L., Chengping L., Chaoyin C., Ling., Robin S., Kunlong B. *In vitro* anti-HIV and -HSV activity and safety of sodium rutin sulfate as a microbicide candidate. Antiviral Research, 2007, 75(3), 227-233.

Kandra L., Gyémánt G., Zajác A., Batta G. Inhibitory effects of tannin on human salivary alpha-amylase. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319(4), 1265-1271.

Kazeem J., Ogunbiyi V., Ashafa. In vitro Studies on the Inhibition of α -Amylase and α -Glucosidase by Leaf Extracts of *Picralima nitida* (Stapf), Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2013,12 (5), 719-725.

Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E., Kefalas P. phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palem fruit (*Phoenix dactylifera*). Food chemistry, 2005, 89, 411-420.

Marles R J., Farnsworth N R., Antidiabetic plants and their active constituents. Phytomedicine, 1995, 2(2), 137-189.

Ngo T., et Lenhoff H. A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase reactions. Analytical Biochemistry, 1980, 105 (1), 389-397.

Osman SM., El Kashak WA., Wink M., El Raey MA. New isorhamnetin derivatives from *Salsola imbricata* Forssk. leaves with distinct anti-inflammatory activity, 2016, 12(45), 47-57.

Oueslati M H., Al-Ghamdi F A., Noubigh A. Two new bioactive salsolanol and biphenylsalsinol from the aerial parts of *Salsola villosa* Delile. ex Schul. (Chenopodiaceae) growing in Saudi Arabia. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2015, 5(8), 624–628

Pegano H - *Salsola vermiculata* Braun-Blanquet & O. de Bolòs - Chaméphytaies halophiles nitrophiles, argillicoles à marneuses, méditerranéennes à atlantico-sahariennes et macaronésiennes, thermoxérophiles, le réseau de la botanique francophone, 1958.

Prabhakar P.K., Doble M. Mechanism of Action of Natural Products Used in the Treatment of Diabète Mellitus. The Chinese Jress and Springer- Verlag, 2011, 17, 563-574.

Quevauvilliers J., Somogyi A., Fingerhut A. Dictionnaire médical de poche. Elsevier Masson, 2007, 524, 153.

Salem J H. Extraction, Identification, Caractérisation des Activités Biologique de flavonoides, l'institut National polytechnique de Lorraine, Thèse de doctorat, 2009, 125-130.

Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. International Journal of Food Science and Technology, 2002, 8, 121-137.

Sefi M., Fetoui H., MakniM., and Najiba Zeghal N. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. J. Food. Chem.Toxicol, 2010, 48, 1986–1993.

Youssefi Z. Evaluation de l'activité antidiabétique in vitro des extraits des trois plantes médicinales locales. Mémoire de master en biochimie, Université Amar Telidji Laghouat, 2016.

Zerargui F. Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives. Thèse de doctorat en sciences, Université Ferhat Abbas Sétif, 2015.

VI. Annexe

VI.1. Figures des spectres UV des fractions isolées

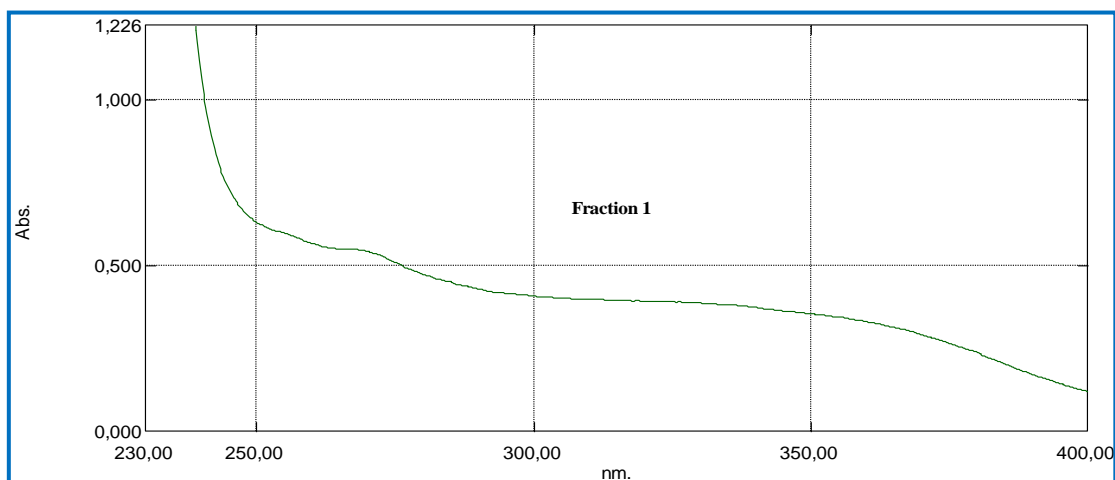


Figure 10: Spectre UV de la fraction 1

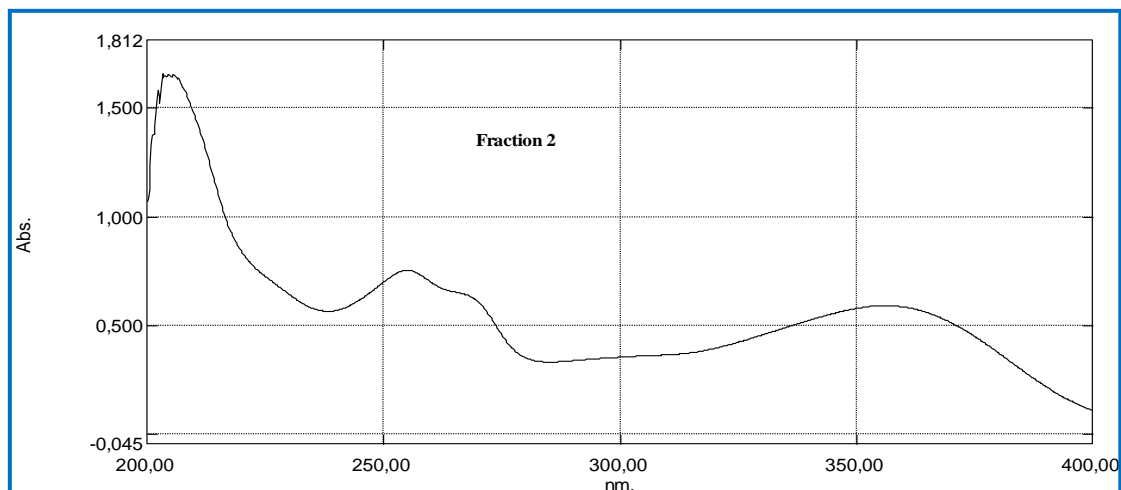


Figure 11: Spectre UV de la fraction 2

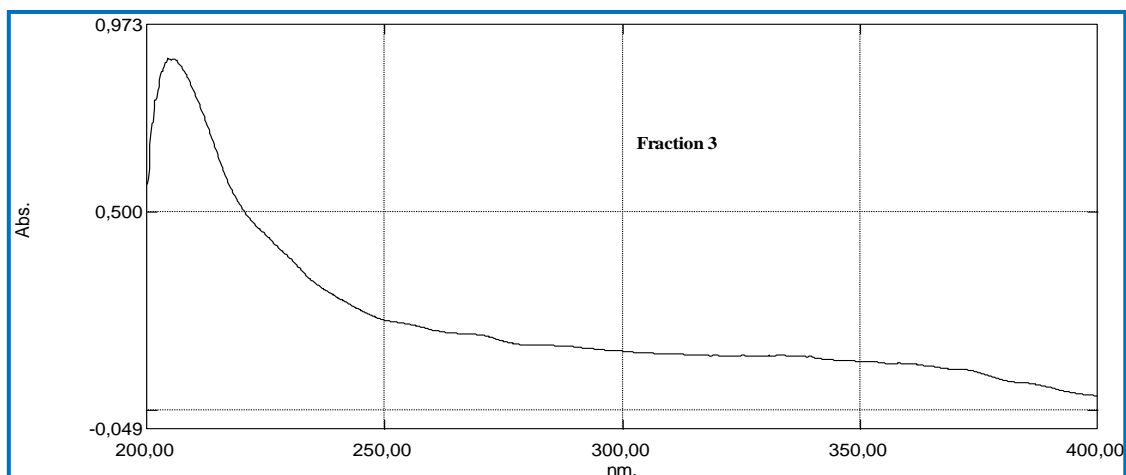


Figure 12: Spectre UV de la fraction 3

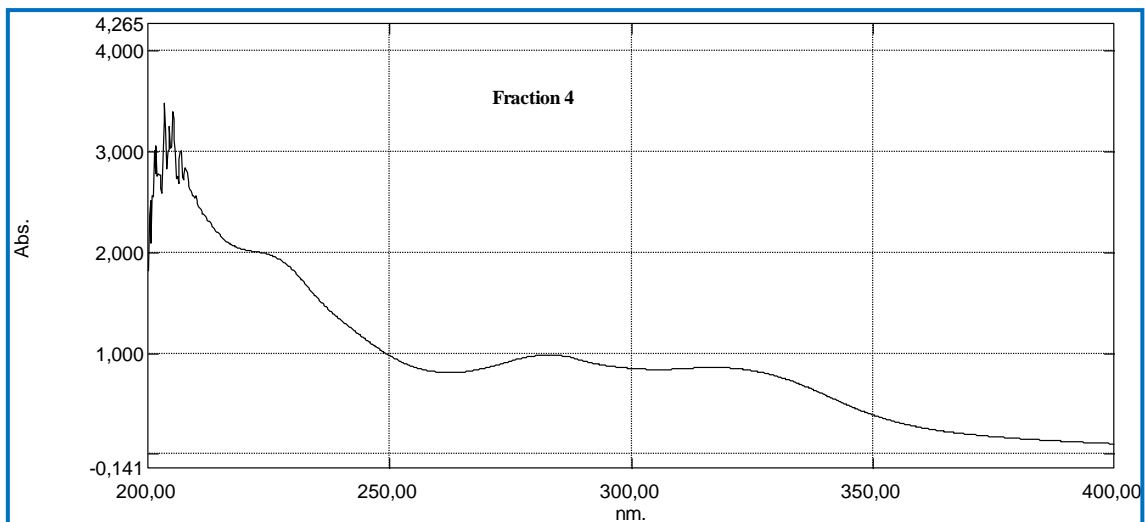


Figure 13: Spectre UV de la fraction 4

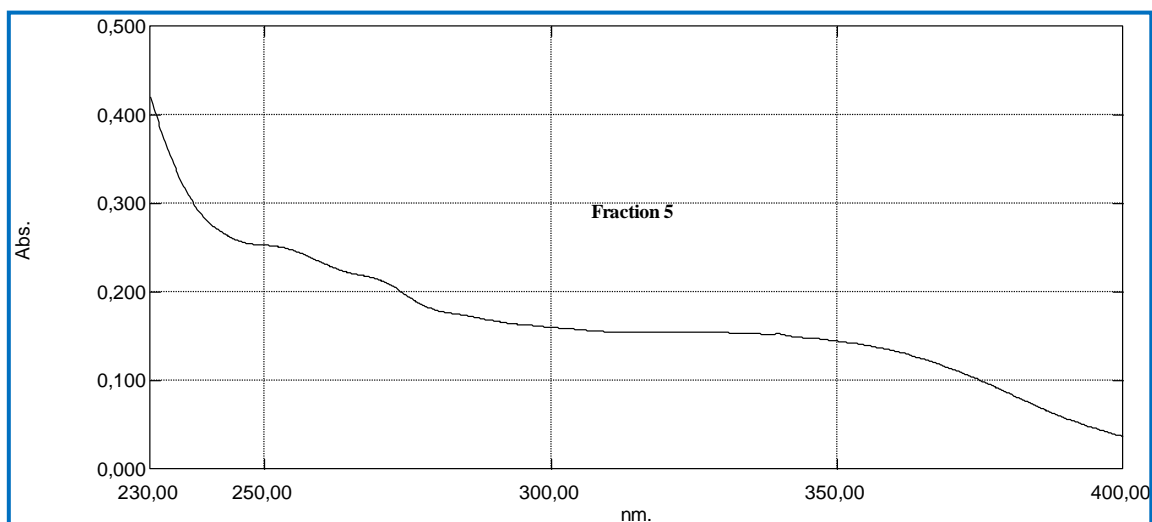


Figure 14: Spectre UV de la fraction 5

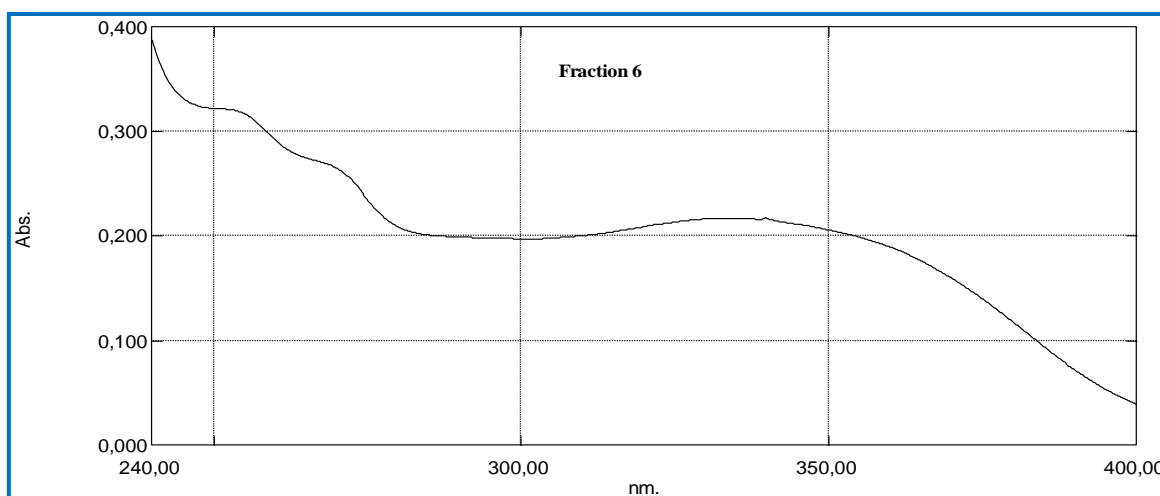


Figure 15: Spectre UV de la fraction 6

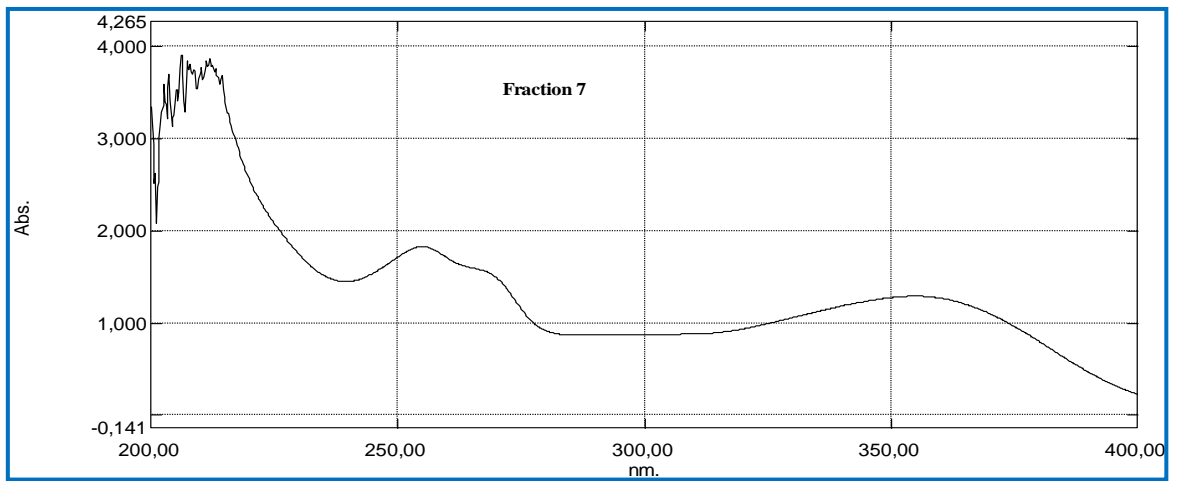


Figure 16: Spectre UV de la fraction 7

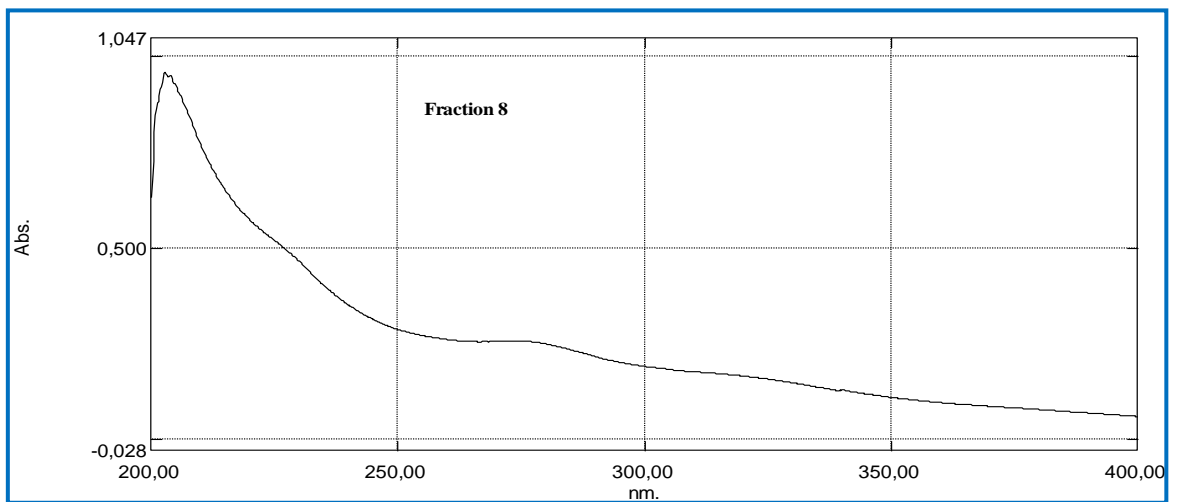


Figure 17: Spectre UV de la fraction 8

VI.2. Figures des chromatogrammes des fractions isolées

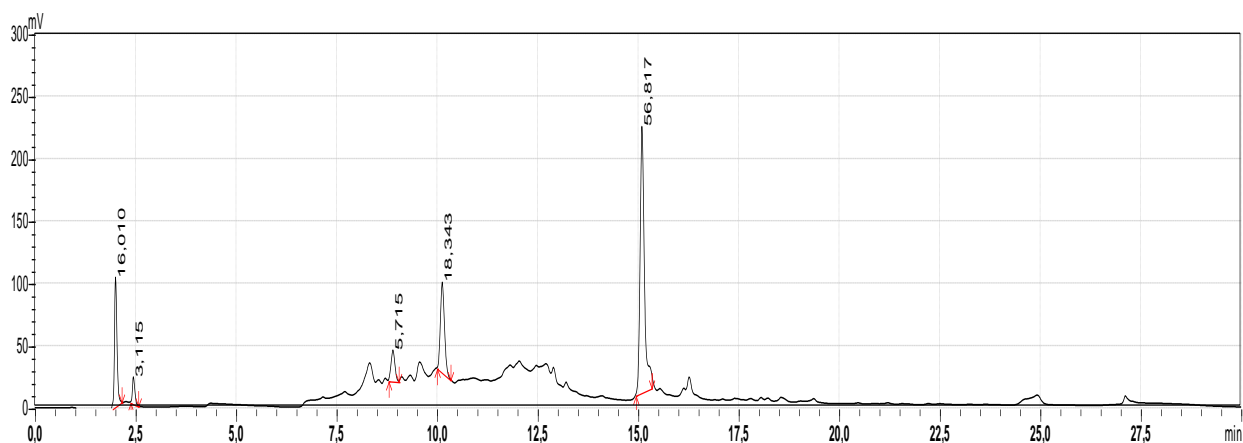


Figure 18 : Chromatogramme CLHP de la fraction 1 mesuré à 254nm

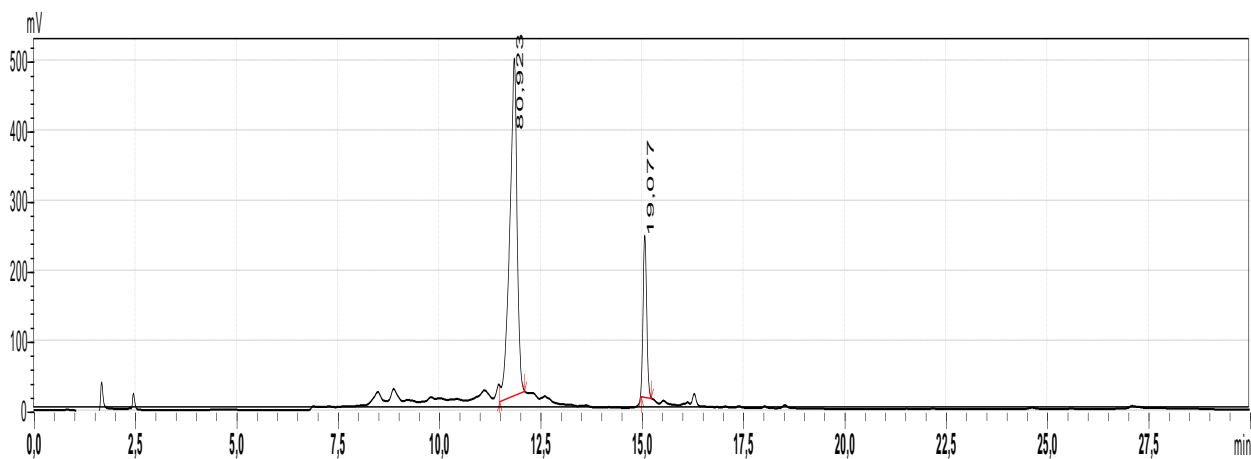


Figure 19 : Chromatogramme CLHP de la fraction 2 mesuré à 254nm

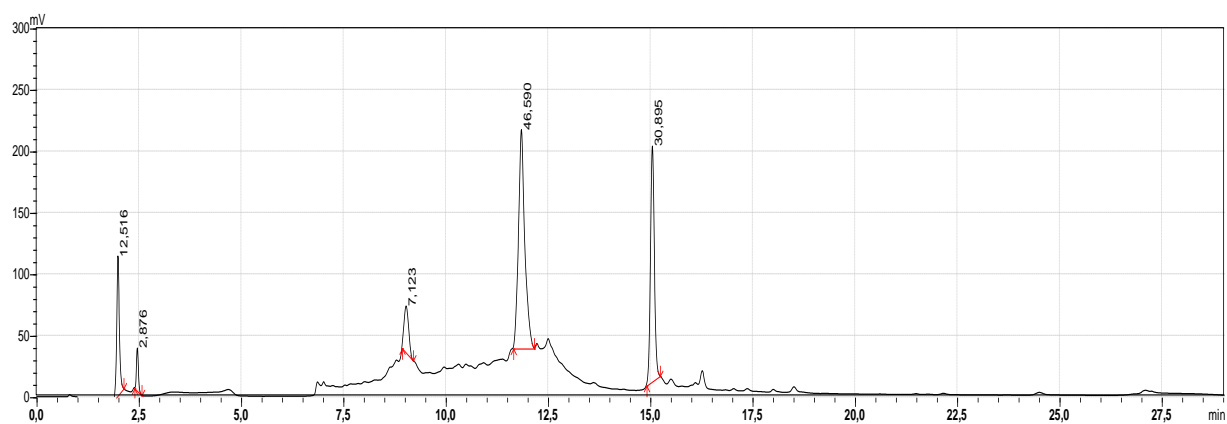


Figure 20 : Chromatogramme CLHP de la fraction 3 mesuré à 254nm

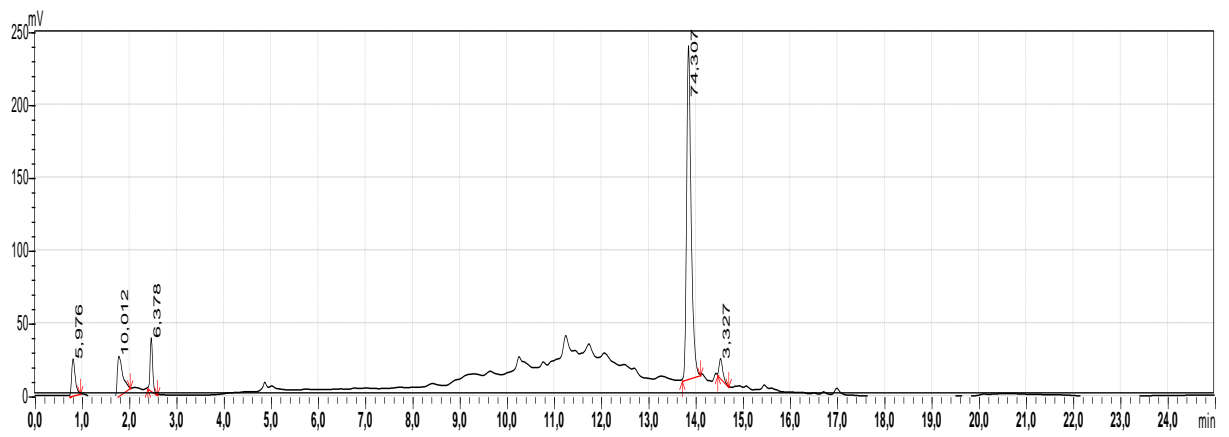


Figure 21 : Chromatogramme CLHP de la fraction 4 mesuré à 254nm

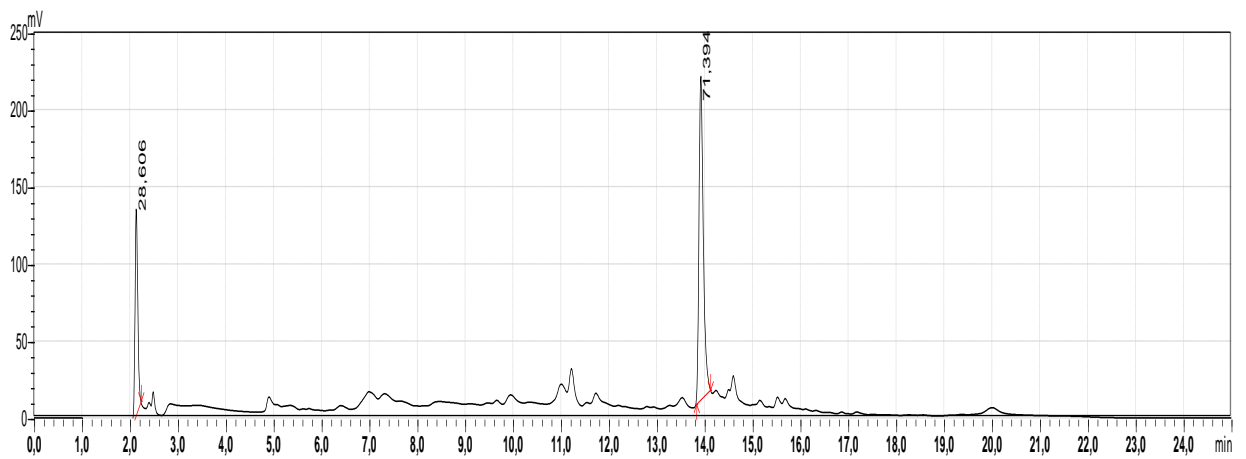


Figure 22 : Chromatogramme CLHP de la fraction 5 mesuré à 254nm

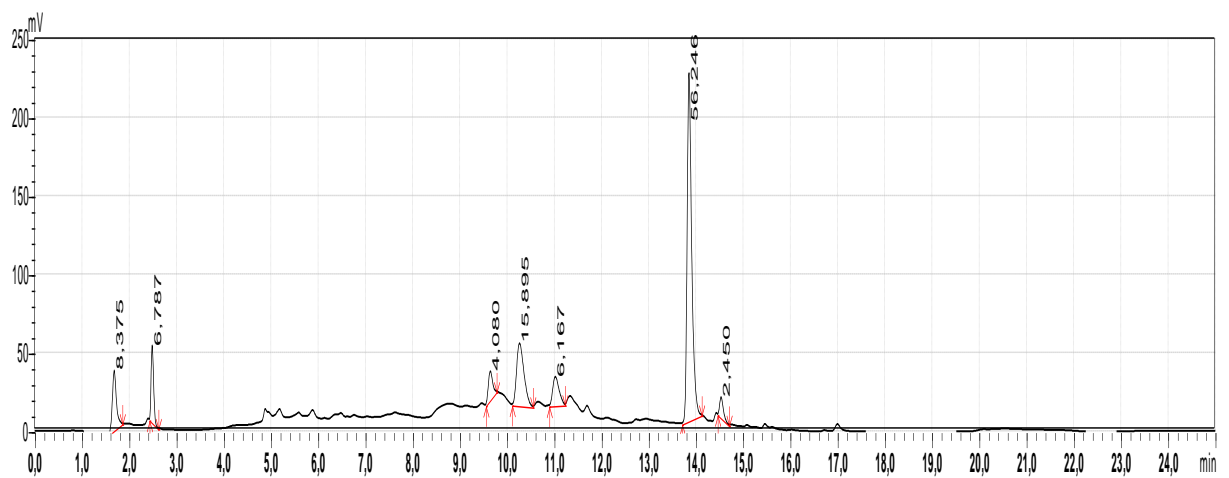


Figure 23 : Chromatogramme CLHP de la fraction 6 mesuré à 254nm

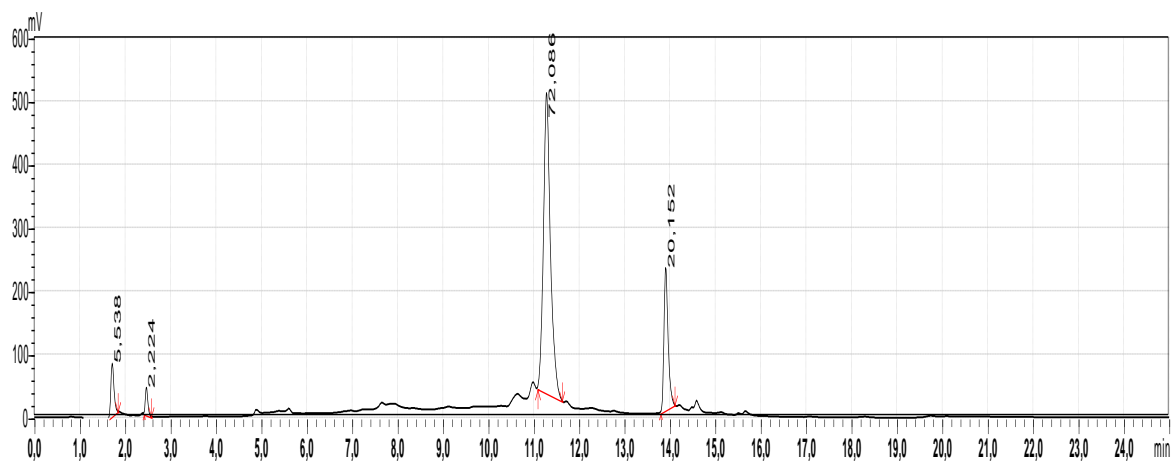


Figure 24 : Chromatogramme CLHP de la fraction 7 mesuré à 254nm

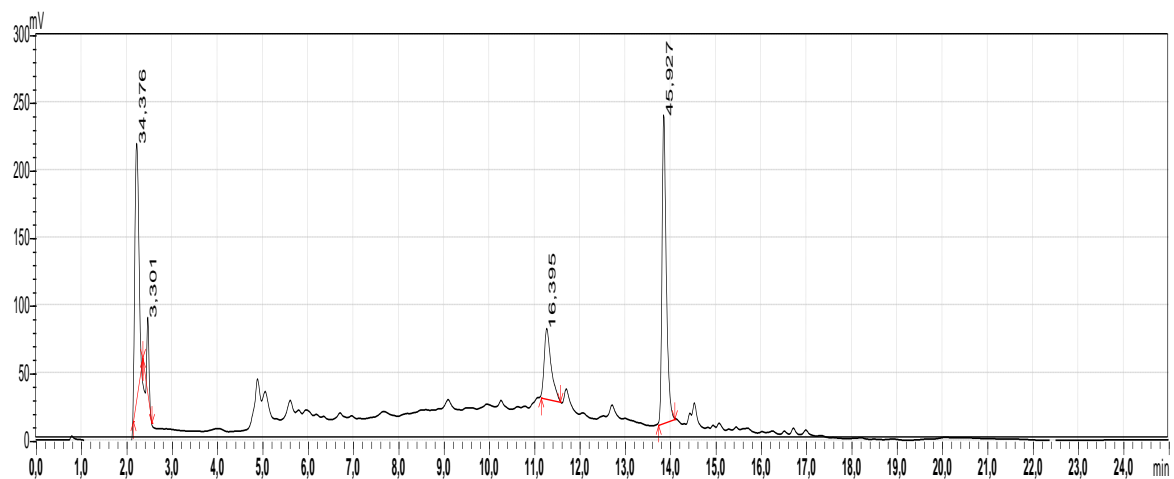
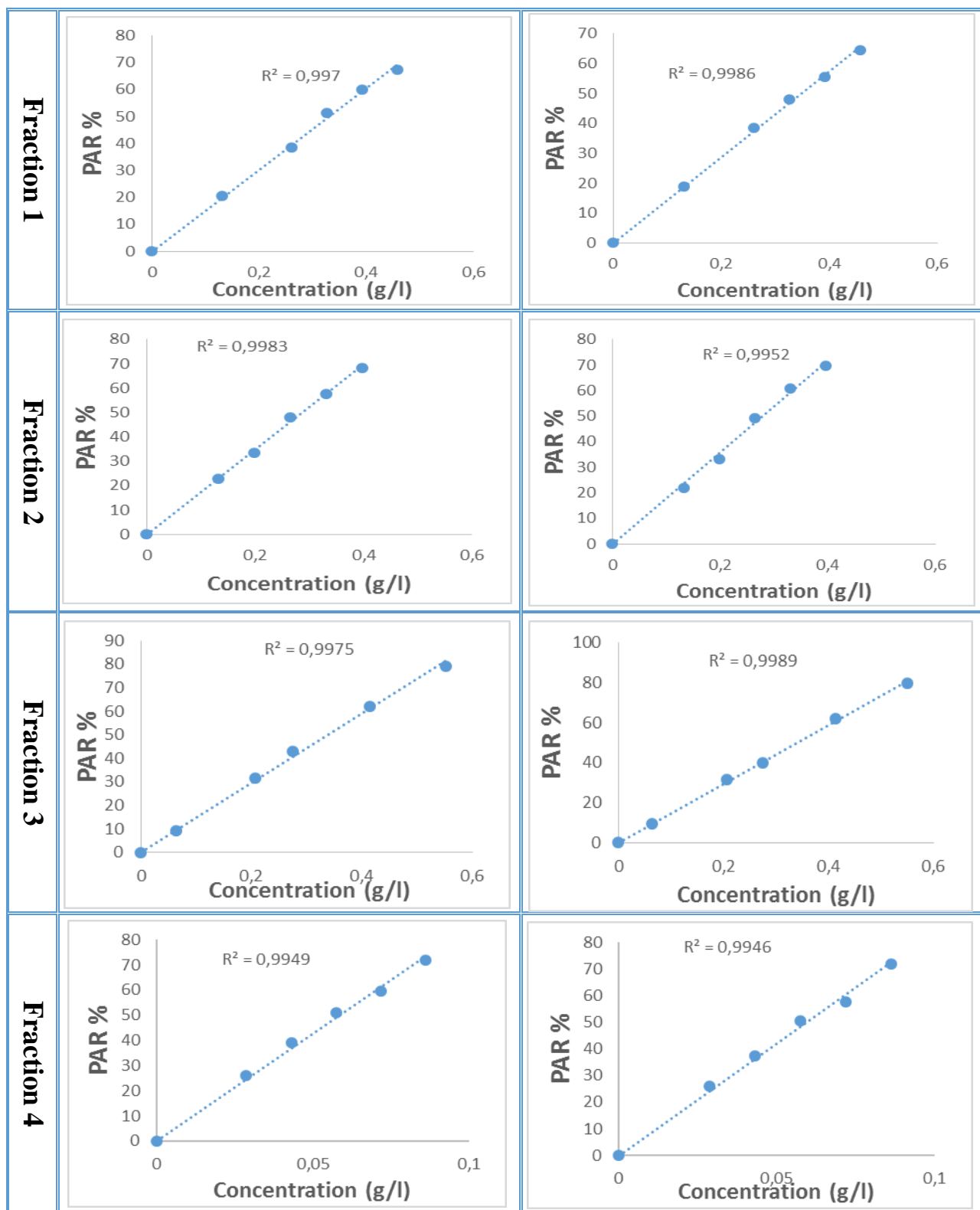


Figure 25 : Chromatogramme CLHP de la fraction 8 mesuré à 254nm

VI.3. Figures du pouvoir antiradicalaire des fractions mesurées par le test du DPPH



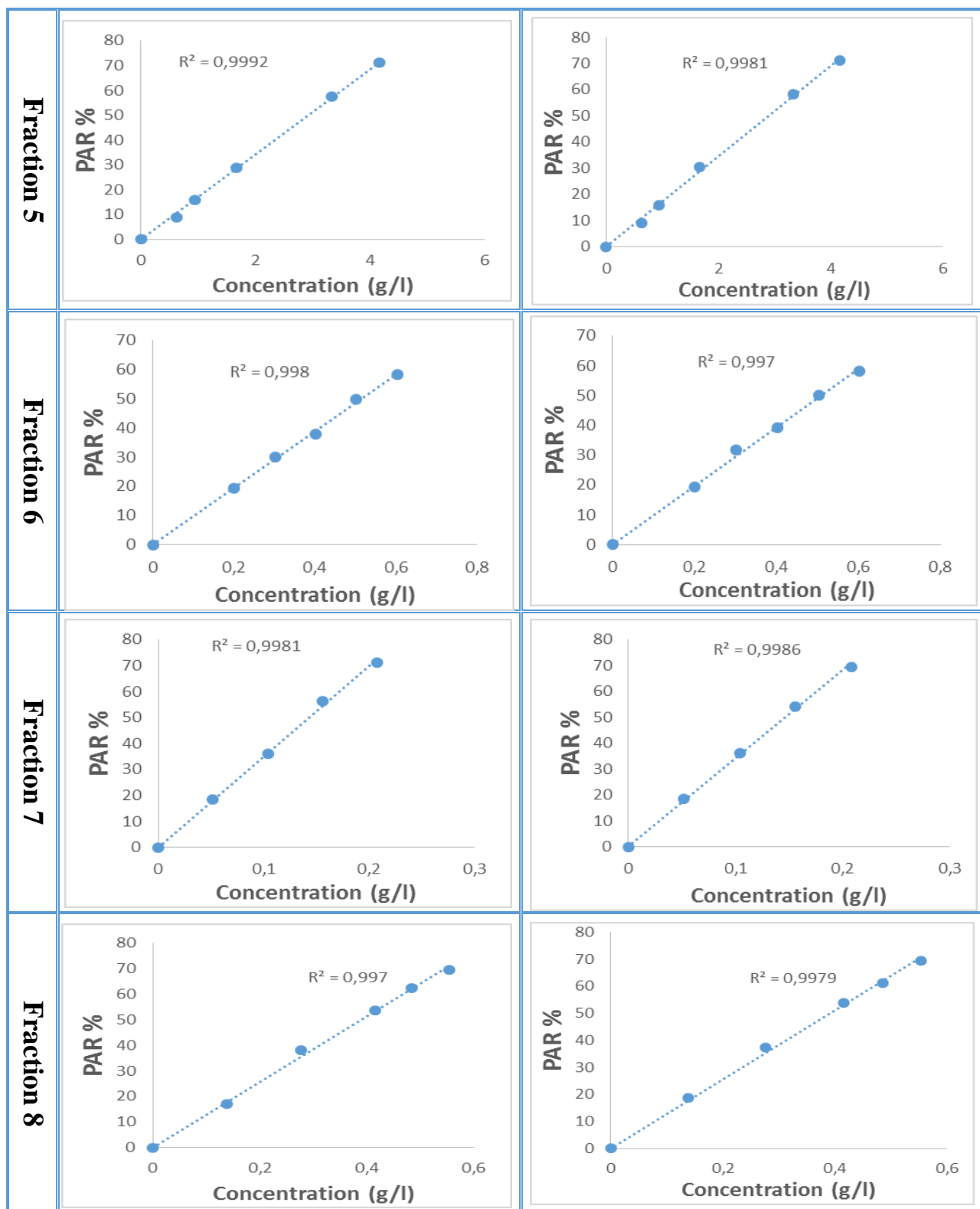
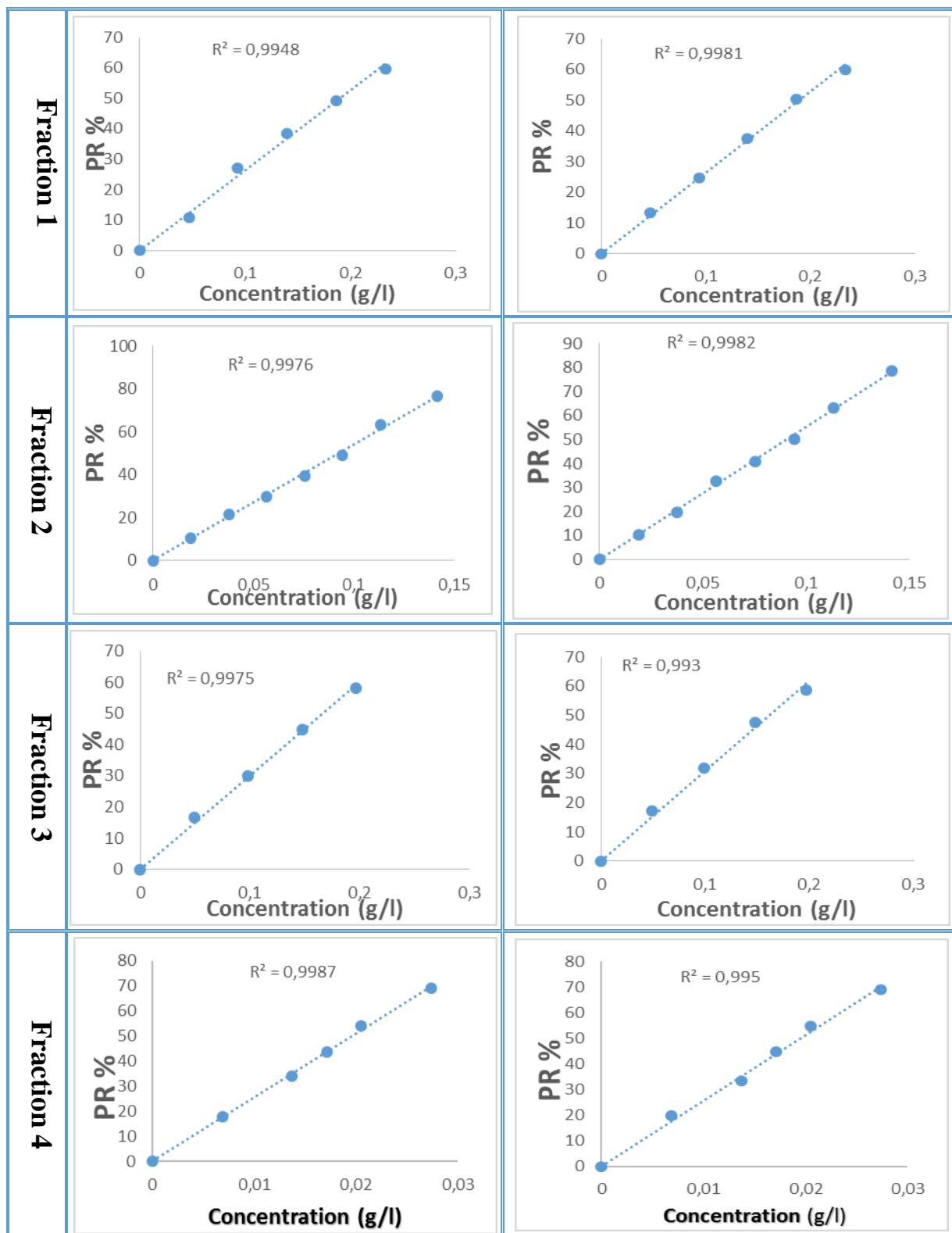


Figure 26 : Pouvoir antiradicalaire des fractions mesurées par le test du DPPH

VI.4. Figures du pouvoir réducteur des fractions mesuré par le test du CUPRAC



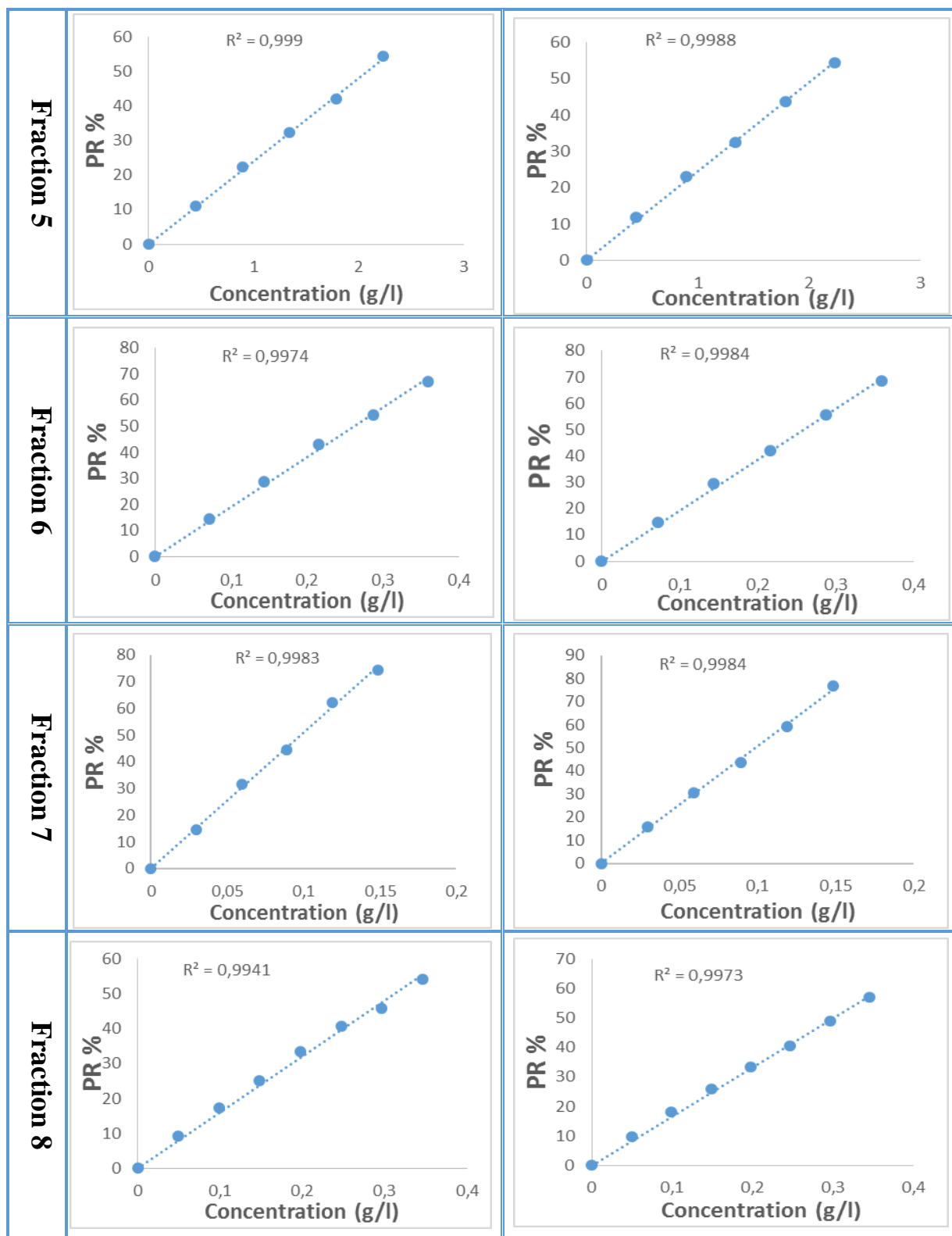
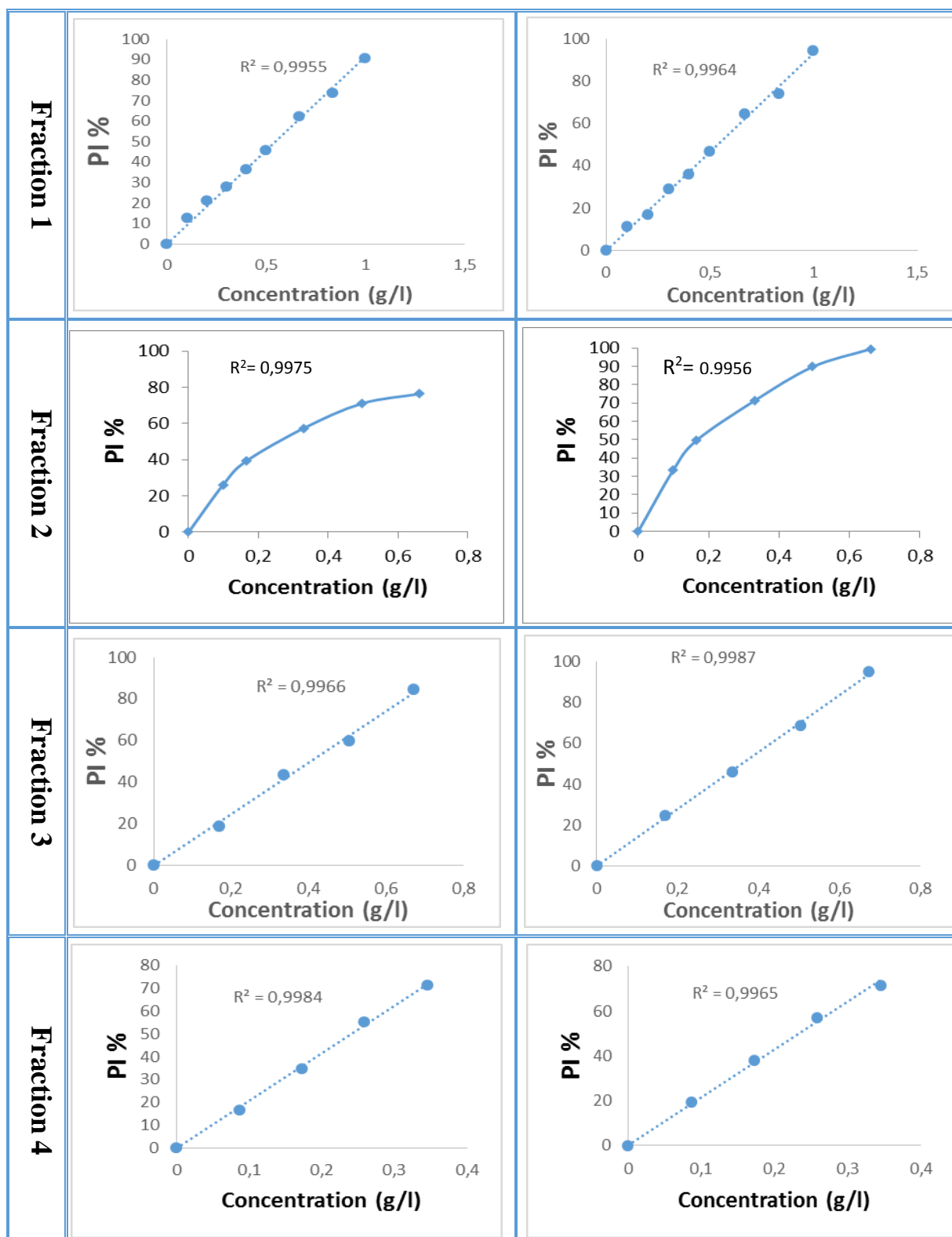


Figure 27 : Pouvoir antiradicalaire des fractions mesurées par le test du CUPRAC

VI.5. Figures du pourcentage d'inhibition des fractions mesuré par le test du α -amylase



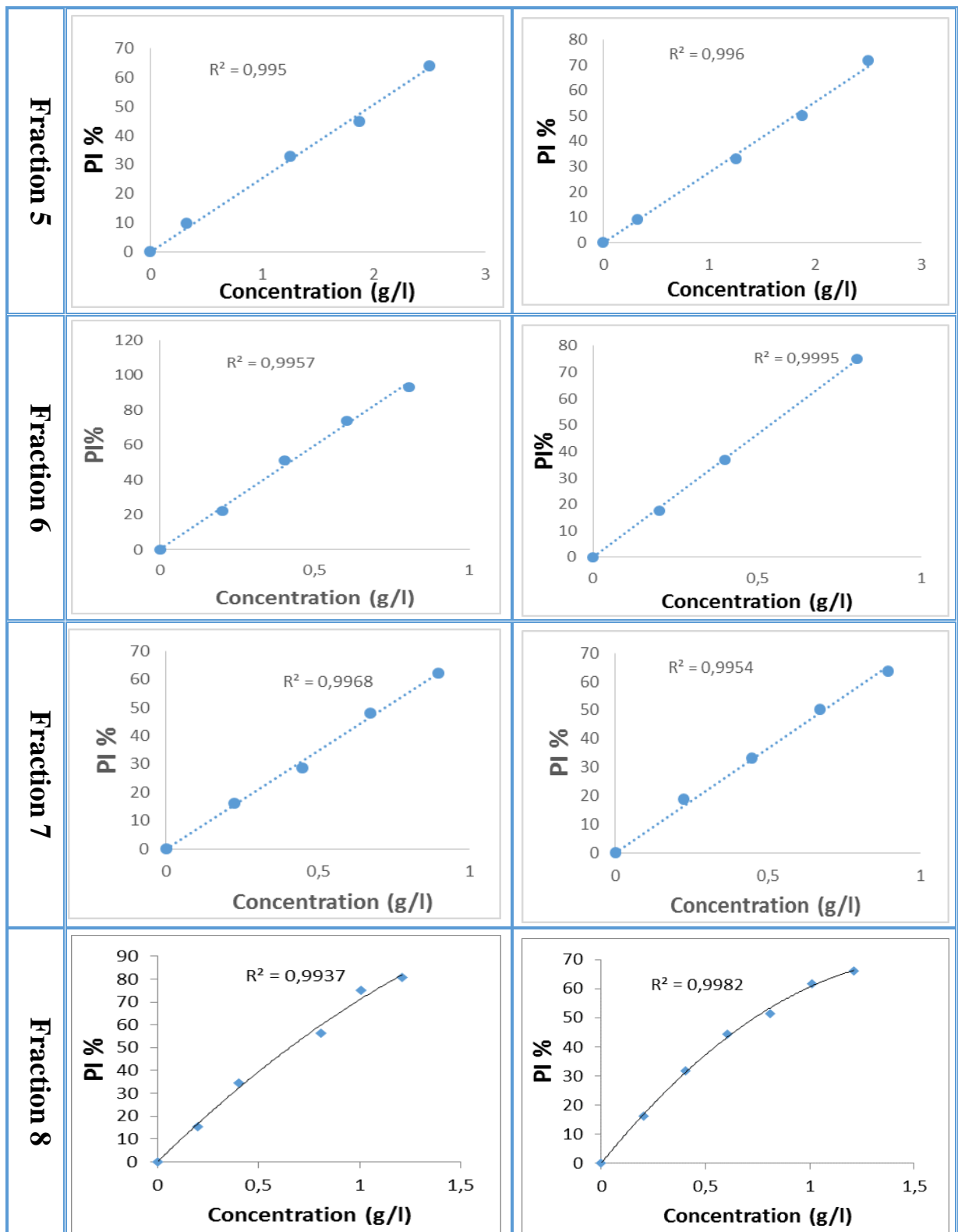
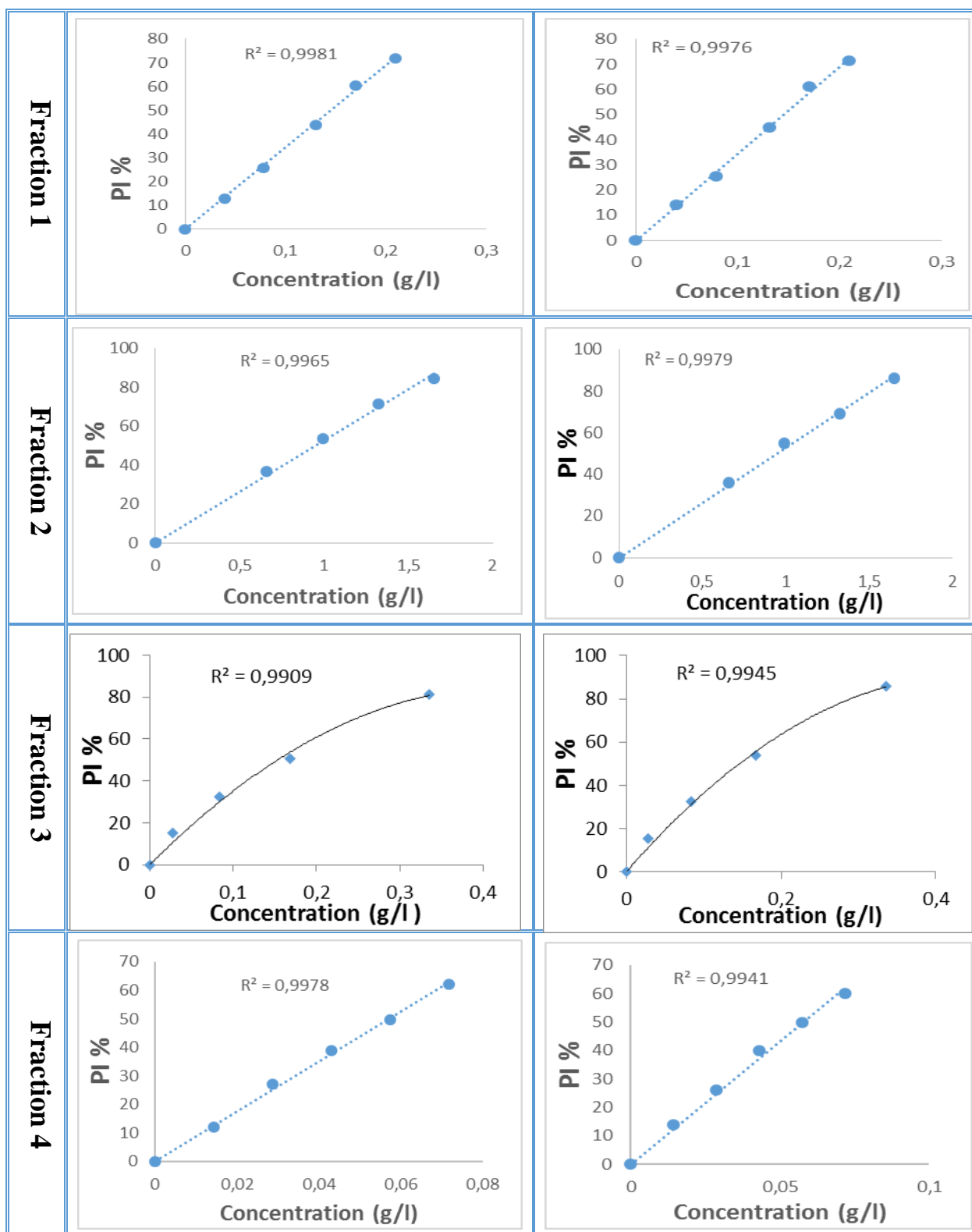


Figure 28 : Pouvoir d'inhibition des fractions mesuré par le test du α -amylase

VI.6. Figures du pourcentage d'inhibition des fractions mesuré par le test du α -glucosidase



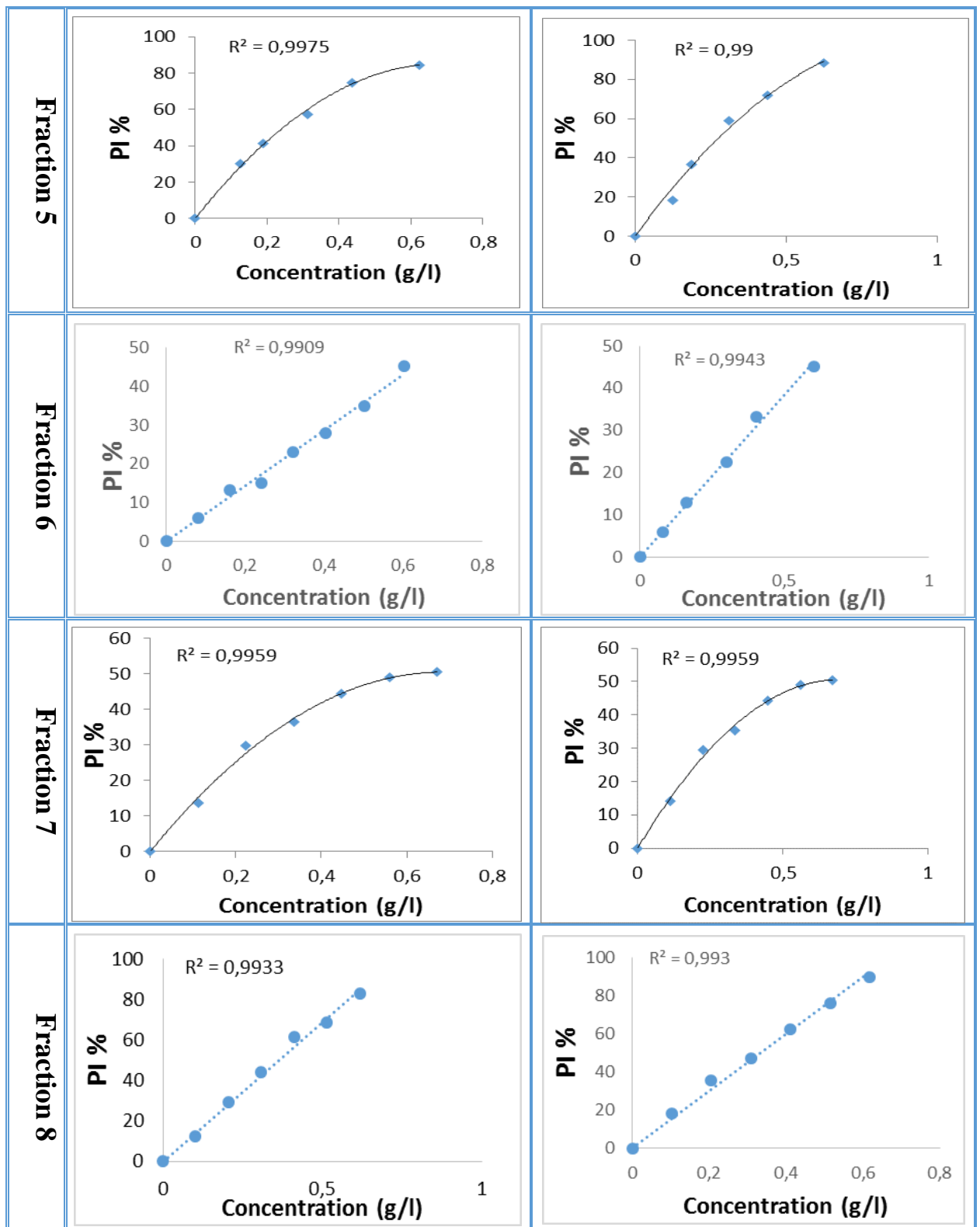


Figure 29 : Pouvoir d'inhibition des fractions mesuré par le test du α -glucosidase