



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE DE SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : Azizi Halima

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Option : Biochimie des produits naturels

Thème

Contribution à l'étude de l'effet inhibiteur sur l' α – amylase des
composés phénoliques et des huiles essentielles de quelques plantes
antidiabétiques locales

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
M ^{me} Khacheba IHCEN	M C B	Rapporteur
M ^{elle} Benabed Khadidja Houda	M A B	Co-rapporteur
Mr Berramdhane Tayeb		Président
M ^{me} kraza Lamia		Examinatrice

JUN 2015

Dédicace

Avant tous je remercie mon dieu qui m'a donné la vie et la volonté d'étudier.

Je dédie ce travail à :

Mes parents, pour leur aide et encouragement.

À mes frères : Hamza, Mouloud, Abbas, Houssine et tous mes petites frères.

À mes sœurs : Khadra, Chikha et tous mes petites sœurs.

À mes amis : Nadia, Djahida, Mebarka et Djalale, Soumia, Zineb et Azzedine, Mariem, , Halima, Nessrine, Sorya, Nacira, Fatima, Amina, Oussama, Zineb, Mahjouba, Rokia, Khadidja, Ikram, Mariem, Achoura, el Abed Ahmed ,Mohamed, Attalah, Abdallâh, Salem, Aziz, Ali, Naima, mes proches.

À tous mes collègues dans l'hôpital et mes proches.

À tous mes collègues dans l'hôpital d'Aflou el hadj Mohamed Sahli, Arabi, Karim, Mohamed, Madani, Karima, Nadjoi, Mariem, Wahiba et mes proches.

A tous ceux qui leurs noms ne se trouvent pas dans cette dédicace mais ils ont toujours une place dans mon cœur.

Remerciements

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

Arrivé au terme de la rédaction de ce mémoire, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma gratitude et mes remerciements à tous ceux qui, par leurs encouragements, leurs soutiens et leurs conseils, m'ont aidé à sa réalisation.

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

J'exprime toute ma reconnaissance envers les membres du jury, qu'il me soit ainsi permis de vous remercier très sincèrement pour avoir spontanément accepté de juger ce travail et d'avoir consacré une partie de votre temps précieux à l'examen de cette mémoire.

Je remercie du profond de mon cœur mon encadreur madame Khacheba Ihen pour ces orientations, ces conseils, ces encouragements, et sa patience.

Je remercie M^{elle} Benabed Khadidja Houda pour ces orientations, ces conseils, ces encouragements, et sa patience

Je remercie M^{elle} boussoussa Hadjer pour ces encouragements et ces conseils

Je remercie du profond de mon cœur les enseignants : Boubrima Youcef, Gouzi Hicham, Chaibi Rachid

Je remercie Khacheba AEK et Khacheba Mohamed

Je remercie le président : Berramdhane el Tayeb

Merci à tous

Résumé

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à cinq plantes antidiabétique locales ; *Ajuga iva*, *Ocimum bacilicum*, *Marrubium vulgare*, *Matricaria pubescens* et *Salvia officinalis*.

Dans le présent travail, nous avons étudié l'effet inhibiteur de leurs composés phénoliques et de leurs huiles essentielles de ces plantes sur l'activité de l' α – amylase.

La teneur en composés phénoliques totaux, doser en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, varient entre 0,57 et 17,23 mg / g en équivalent acide gallique (GAME). Alors que les concentrations des flavonoïdes détectés en utilisant le chlorure d'aluminium varient entre 0,51 et 8,37 mg / g en équivalents de la rutine (RE).

Tous les extraits ont montré des effets inhibiteurs vis-à-vis de l' α – amylase, avec des valeurs d'IC₅₀ qui varient entre 6.00 et 58.79 mg / ml pour les extrait phénoliques et entre 26.41 et 88.98 mg / ml pour les extraits d'huiles essentielles, dont la meilleure inhibition a été enregistré pour l'extrait d'huile essentielle de la plante *Matricaria pubescens* (IC₅₀ = 26,41 mg / ml).

Mots clés : composés phénoliques, huiles essentielles, effet inhibiteur, α – amylase, plantes antidiabétiques.

Summary

In this work, we have five antidiabetic plants: *Ajuga iva*, *Ocimum bacilicum*, *Marrubium vulgare*, *Matricaria pubescens* and *Salvia officinalis*.

In this study, we have studied the inhibitory effects of their phenolic compounds and their essential oils on the activity of α - amylase.

The total phenolic compounds content, assayed using Folin-Ciocalteu reagent, ranged from 0.57 to 17.23 mg /g, expressed as Gallic acid equivalent (GAE). Whereas, the total flavonoids concentrations, detected using of the aluminum chloride ranged from 0.51 to 8.37 mg /g, expressed as Rutine equivalents (RE).

All of extracts have inhibitory effects on the α – amylase, with IC₅₀ values ranging from 6.00 to 58.79 mg / ml for the phenolic extracts and from 26.41 to 88.98 mg / ml for the essential oil

extracts, whose greatest inhibition was found for the essential oil of *Matricaria pubescens* (IC₅₀ = 26,41 mg / ml).

Keywords : phenolic compounds, essential oils, inhibition effect, α – amylase, antidiabetic plants.

ملخص

ضمن عملنا هذا، نتطرق إلى خمس نباتات محلية تستعمل لعلاج مرض السكر؛ الشندقورة، الحبق، تيمريوت، قرتوفة والميرامية. قمنا بدراسة تأثير كايح المركبات الفينولية و الزيوت الطيارة للنباتات المدروسة على نشاط الالفا أميلاز. تبين أن مردود المركبات الفينولية و التي تمت معايرتها باستعمال كاشف Folin-Ciocalteu تكون بين 0.57 و 17.23 ملغ/مغ مكافئ حمض الغاليك. اما بالنسبة لتراكيز الفلافونويدات تم الكشف باستخدام كلوريد الالومنيوم والنتيجة ظهرت بين 0.51 و 8.37 ملغ/مغ مكافئ الروتين.

كل المستخلصات اثبتت تأثيرها المثبط على الالفا أميلاز، مع قيم ال IC50 المتباينة بين 0.06 و 0.59 ميكروغرام/مل بالنسبة للمركبات الفينولية، و بين 0.26 و 0.89 ميكروغرام/مل بالنسبة للزيوت الطيارة، اين تم تسجيل أهم تثبيط لمستخلص زيت القرطوفة IC50=26.41 ملغ/مل.

الكلمات المفتاحية: المركبات الفينولية، الزيوت العطرية، تأثير الكايح، α - الأميلاز، النباتات المضادة لمرض السكر.

Table des matière

Dédicace.....	I
Remerciements.....	II
Résumés.....	III
Liste des figures.....	VI
Liste des tableaux.....	VII
Liste des abréviations.....	VIII
Introduction.....	1

INTRODUCTION GENERALE 2

I. GENERALITES

I.1. Le diabète.....	3
I.1.1. Définition.....	3
I.1.2. Classification.....	3
I.1.3. Epidémiologie.....	4
I.1.4. Traitement.....	4
I.1.5. Nouvelle alternative de traitement.....	5
I.2. Inhibition de α -amylase.....	6

II. PARTIE EXPERIMENTALE

II. 1. Matériel végétal.....	7
II. 2. Prétraitement des échantillons.....	8
II. 3. Quelques Tests phytochimiques des composés phénoliques.....	8
II.4. Préparation des extraits.....	9
II.4.1. Extraction des composés phénoliques.....	9
II.4.2. Extraction des huiles essentielles.....	11
II.5. Dosage des composés phénoliques.....	11

Table des matière

II.5. 1. Dosage des phénols totaux.....	11
II. 5. 2. Dosages des flavonoïdes.....	12
II.6.Effet d'inhibition des plantes sur l' α – amylase	12
II.6.1. Principe de la méthode de dosage par le DNS.....	12
II.6.2. Test d'inhibition	14
II.6.3. Étude du pouvoir anti- amylasique	15

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Tests phytochimiques.....	16
III. 2. Préparation des extraits.....	18
III.3. Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes.....	21
III. 4.Effet d'inhibition des cinq plantes sur l' α – amylase.....	23
III.4.1.Test d'inhibition	23
III.4.2. Étude du pouvoir anti-amylasique.....	25

CONCLUSION GENERALE	29
----------------------------------	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	31
--	----

Liste des figures

Figure 1 : Produits de dégradation de l'amidon par l' α – amylase.....	14
Figure 2 : La réaction du réactif DNS avec un sucre réducteur.....	15

Liste des tableaux

Tableau 1. Les différentes classes thérapeutiques d'antidiabétiques.....	05
Tableau 2. Nom, utilisation et photo des plantes investiguées.....	08
Tableau 3. Résultats des tests phytochimiques sur les plantes.....	18
Tableau 4. Teneurs, aspect et couleurs des extraits des plantes étudiées.....	20
Tableau 5. Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des plantes étudiées.....	23
Tableau 6. Taux d'inhibition des extraits phénoliques et des huiles essentielles des plantes étudiées vis - à vis de l' α - amylase.....	25
Tableau 7. Valeurs des IC_{50} des extraits des plantes sélectionnées vis - à vis de l' α - amylase.....	27

Liste des Abréviations

DNS	Acide 3,5- d initrosalicylique.
DPP-4	Di Peptidyl Peptidase-4
EAG	Equivalent d'Acide G allique.
GA	G allic Acid
GAE	G allic Acid Equivalent.
GIP	G lucose-Dependant I nsulinotropic P olypeptide.
GLP-1	G lucagon-Like P eptide 1.
IC₅₀	I nhibition Concentration at 50 %
MODY	M aturity Onset D iabetes in the Y oung.
MS	M atière S èche.
OMS	O rganization M ondiale de la S anté.
ER	Equivalents de la R utine.

Introduction
générale

Introduction générale

Depuis longtemps à travers l'histoire, les produits naturels à base de plantes ont joué un rôle important au cours de la vie de l'êtres humains, particulièrement comme sources de nourriture et remèdes traditionnels (**Leland., et al.2006**).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80% de la population du monde se fonde sur la médecine traditionnelle pour leurs besoins en soins de santé primaires. (**Boulanouar.,et al. 2013**).

La valeur médicinale des plantes, est due aux produits du métabolisme qu'elles synthétisent, plus précisément les métabolites secondaires qui produisent une multitude d'action bénéfique sur le corps humain. Parmi les constituants bioactifs les plus important, on note les composés phénoliques, les alcaloïdes et les huiles essentielles qui ont fait l'objet de nombreuse études pour leurs activités biologiques (Antioxydants, Inhibiteurs d'enzyme, Antimicrobiens) (**Leland et al., 2006; Da Silva., et al., 2014**).

L'objectif de notre travail est la confirmation de l'activité antidiabétique de ces plantes par l'inhibition de l'enzyme clé qui est l' α -amylase et ainsi leurs usages en thérapeutique traditionnelle.

Le présent travail, entre dans le cadre de la valorisation de cinq plantes médicinales locales (*Ajuga iva*, *Ocimum basilicum*, *Marrubium vulgare*, *Matricaria pubescens* et *Salvia officinalis*), utilisées en thérapeutique traditionnelle dans la région de Laghouat, comme antidiabétique. Cette étude, consiste en une contribution à l'étude de leurs composés phénoliques et leurs huiles essentielles en tant qu'inhibiteur d' α -amylase ; l'enzyme clé de la première étape du processus digestif des hydrates de carbone (responsables en partie à l'augmentation de la glycémie et l'apparition du diabète sucré). Les inhibiteurs de cette enzyme retardent l'hydrolyse des hydrates de carbone et prolongent et réduisent leurs taux d'absorption, induisant une stabilité du taux de glucose plasmatique (**Bhandari et al., 2008 ; Djelili et al., 2008**).

Introduction générale

- La première partie de ce mémoire, est consacrée aux généralités sur le diabète et le stress oxydant.
- La seconde partie, est réservée à la description des protocoles de préparation des extraits, du dosage des phénols totaux et des flavonoïdes et pour finir à l'étude de l'effet inhibiteur de ces extraits naturels sur l'activité enzymatique de l' α – amylase.
- Les résultats ainsi que leurs discussions seront présentées dans la dernière partie.

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

Généralités

I. le diabète

I.1. Définition

Le mot diabète, signifie « passer à travers » en référence à la forte polyurie qui caractérise la maladie. (**khalfa, 2009**) et en latin, voulant dire « a adouci avec miel » ce rapporte à la présence de sucre dans l'urine des patients ayant la maladie. (**Rutter, 2000**).

Le diabète, est une anomalie du métabolisme des glucides caractérisée par une glycémie à jeun ≥ 1.26 g/L (7mmol/L) et/ ou ≥ 2 g/L (11 mmol/L) à un moment quelconque de la journée ou 2 heures après un test d' hyperglycémie provoquée (**Prudhomme, 2008**).

I.2. Classification

La classification ancienne des diabètes reposait sur le mode de traitement de la maladie. On distinguait : diabète insulino-dépendant(DID), et diabète non insulino-dépendant(DNID) (**Giraud, 2010**).

La classification actuelle des diabètes (datant de 1997), repose sur l'étiopathogénie. D'après cette classification, il existe 4 principales formes de diabètes : diabète de type I, diabète de type II, diabètes secondaires (ou diabètes spécifiques) et diabète gestationnel (**Giraud, 2010**).

1. Diabète de type I : diabète insulino-dépendant (DID) ou diabète juvénile (**Prudhomme, 2008**). Dans laquelle l'hyperglycémie est due à une destruction auto-immune des cellules β (secrétant l'insuline) des îlots de Langerhans par des lymphocytes T auto - réactifs (**Richard, 2010 ; Pierre, 2006**).

2. Diabète de type II : diabète non insulino-dépendant (DNID) ou diabète de la maturité dans laquelle l'hyperglycémie est due à une carence relative en insuline liée à une insulino - résistance et/ou à une insulino - pénie (**Bastard et al., 2001; Giraud 2010**).

3. Diabètes secondaires : sont dus à des causes diverses : endocrinopathies (phéochromocytomes, acromégalie, syndrome de Cushing, hyperthyroïdie, tumeurs endocrines pancréatiques et digestives) à des dysfonctionnements d'origine génétique des cellules β (diabète MODY [Maturity Onset Diabetes of the Young] et diabète mitochondrial). Il peut être aussi à l'origine des médicaments, des composés chimiques ou composés toxiques (**Velho et al., 1996**).

4. Diabète gestationnel : Le diabète gestationnel apparaît au cours du 3^e trimestre de la grossesse et disparaît après l'accouchement, Il se caractérise par une hyperglycémie modérée, sans gravité pour la mère mais pouvant avoir des répercussions sur l'enfant (**Pierre, 2006**).

I.3. Epidémiologie

Aujourd'hui, toutes les études s'accordent à dire que les maladies métaboliques et nutritionnelles et à leur tête le diabète sont en train de prendre des proportions alarmantes, En effet, en 2001, le nombre de diabétiques était évalué à 177 millions et l'OMS prévoit une population de 366 millions de diabétiques pour 2030. Véritable épidémie mondiale, comme le décrit l'Organisation mondiale de la santé, le diabète est la première maladie non transmissible reconnue par les Nations unies comme une menace pour la santé mondiale aussi grave que les épidémies infectieuses, telles que le paludisme, la tuberculose et le sida (**Senhaji et al., 2014**).

I.4. Traitement

Pour le diabète de type I, le traitement est strictement par l'administration d'**insuline** additionner d'exercices physiques et d'une alimentation équilibrée. Tandis que le traitement essentiel du diabète de type II se résume en un régime alimentaire associé aux exercices physique permettant principalement la perte de poids. En cas d'insuffisance pour rétablir l'équilibre glycémique, un retour au antidiabétique oraux par voie orale est obligatoire (**Prudhomme, 2008; Richard, 2010**).

Le tableau 1 résume les différentes classes d'antidiabétiques avec leurs mécanismes d'action, leur voie d'administration et leurs posologies.

Tableau 1. Les différentes classes thérapeutiques d'antidiabétiques (**Pillon., et al, 2014**)

Classe Pharmacologique	Mécanisme d'action	Voie	Nombre de prises par jour
sulfamides	Augmentation de la sécrétion d'insuline	Orale	1 à 2 prises/jour
hypoglycémiant			
Biguanides	Effet antihyperglycémiant	Orale	1 à 3 fois/jour
Inhibiteurs de la DPP-4	Augmentation des concentrations endogènes d'incrétine	Orale	1 fois/jour
Inhibiteurs de SGLT-2	Réduction de la réabsorption du glucose au niveau du tubule contourné proximal	Orale	1 fois/jour
Analogues des GLP-1	Augmentation de la sécrétion d'insuline et suppression de la sécrétion du glucagon	Injectable	1 à 2 injections/ Jour
Insuline	Active directement le récepteur à l'insuline	Injectable	1 à 4 injections/ jour en fonction de la durée d'action de l'insuline

I.5. Nouvelle alternative de traitement

Les hypoglycémiant de synthèse, sont susceptibles de causés beaucoup d'effets secondaires, de ce fait pour pallier aux effets secondaires des traitements antidiabétiques, les recherches scientifiques ce sont tournées vers les plantes en raison de leur disponibilité, leur faible coût et leurs moindre effet secondaire. Actuellement, en compte environ 1123 espèces de plantes utilisées traditionnellement contre le diabète; on donne par exemples (*Ranunculus repens*, la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) et le figuier commun (*Ficus carica*) (**Raccah, 2004; Azzi, 2012**).

Les propriétés médicinales des plantes sont dues à des produits du métabolisme. Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont indispensables à leur existence. Ceux-ci englobent des protéines, des lipides et des hydrates de carbone qui servent à la subsistance et à la reproduction, non seulement de la plante elle-même mais encore des animaux

qui s'en nourrissent. De plus, les plantes synthétisent une gamme extraordinaire d'autres composés appelés métabolites secondaires. De nombreux métabolites secondaires sont des « antibiotiques » au sens large, car ils protègent les plantes contre les champignons, les bactéries, les animaux et même les autres plantes (**Small et Catling, 2000**).

Les métabolites secondaires ne sont pas essentiels pour la croissance et le développement de la plante, mais sont impliqués dans son adaptation environnementale aux conditions biotiques et abiotiques, mais, disposant de nombreuses vertus curatives pour l'Homme (**Fett-Neto, 2010**). On peut citer, les métabolites les plus intéressent sont composés phénoliques et les huiles essentielles (Anti-inflammatoires, Antivirales, Antiseptiques, Antioxydants, Anti-diarrhéique, Antiallergique, Antidiabétique etc.) (**Iserin, 2001 ; Fernandez et Chemat, 2012 ; Hüsnü Can Baser et Buchbauer, 2010**).

I.7. Inhibition de α -amylase

L' α - amylase, est une enzyme glycolytiques sécréter 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).

D'où, les inhibiteurs de l'hydrolyse des hydrates de carbone par l' α - amylase dans le tractus digestif retardent leur digestion et prolongent 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**).

Partie
expérimentale

II. 1. Matériel végétal

Notre étude, a été réalisée sur 5 plantes connus pour leurs pouvoirs hypoglycémiant par la population diabétique locale de la ville de Laghouat. Les 5 plantes, ont été récoltées dans les environs du chef-lieu (El - assafia et Tadjmout), pendant le mois de Mars 2015. Les différentes données (nom local, nom vernaculaire, parties des plantes utilisées, méthode de préparation...) ont été obtenues suite à une enquête ethnobotanique, chez différent herboristes de la ville de Laghouat ayant la connaissance des propriétés curatives de ces plantes. Le nom, l'utilisation ainsi que la photo de chaque plante sont présentés dans le **Tableau 2**.

Ces plantes ont déjà fait l'objet d'études sur leurs activités antioxydantes et inhibitrices d'enzyme dans le laboratoire des sciences fondamentales de l'université de Laghouat.

Partie expérimentale

Tableau 2. Nom, utilisation et photo des plantes investiguées (Schauenberg,1977 ; Beloued, 2003 ; Chehma, 2006 ; Schauenberg, 2010)

Nom de la Plante	Utilisation	Photos (originale)
<p>Famille: Asteracées. Nom vernaculaire : قرطوفة Nom français : Camomille Nom latin : <i>Matricaria pubescens</i></p>	<p>Elle est très réputée par ses qualités aromatiques.</p> <p>Alimentation: Elle est utilisée pour aromatiser les soupes, particulièrement durant le mois de Ramadhan.</p> <p>Pharmacopée: Elle est utilisée en infusion pour faciliter la digestion.</p> <p>Intérêt pastoral: Elle est surtout broutée par les chèvres.</p>	
<p>Famille : Labiées Nom vernaculaire : شندقورة Nom français : Ivette Nom latin : <i>Ajuga iva</i></p>	<p>Antispasmodique, tonique, fébrifuge, diurétique, antiarthritique, apéritive, contre les affection fébriles comme la grippe. Maux de tête, des reins et de vessie.</p>	
<p>Famille : Lamiacées Nom vernaculaire : سواك النبي Nom français : Sauge Nom latin : <i>Salvia officinalis</i></p>	<p>la vertu thérapeutique la plus remarquable est l'inhibition de transpiration. La sauge arrête la lactation ; elle est spasmolytique, stimulante, antidiarrheique et possède une action œstrogène.</p> <p>L'infusion de sauge est indiquée dans le cas de troubles nerveux, vertiges, tremblements, états dépressifs.</p>	

Partie expérimentale

Famille : Lamiacées

Nom vernaculaire : الحبق

Nom français : Basilic

Nom latin : *Ocimum basilicum*

le basilic a un effet antispasmodique gastrique, un tonique stomachique, carminatif et galactogène. Son usage culinaire comme condiment est largement répandu.



Famille : Labiées

Nom vernaculaire : تمر يوت

Nom français : Marrube

Nom latin : *Marrubium vulgare*

Plante Vivace, ligneuse de 30 à 80 cm, tige érigée et rigide, feuilles arrondies, faiblement dentées.

On utilise en infusion comme expectorant dans divers affections (gastro-intestinale, hépatique et biliaire)



II. 2. Prétraitement des échantillons

Après la récolte, les plantes ont été séchées à température ambiante, à l'abri de la lumière et dans un endroit sec et bien aéré. Une fois séchées, une partie de chaque plante a été broyées et tamisées en vue d'obtenir la même granulométrie, et conserver dans des sacs en papier bien fermés jusqu'à son utilisation pour l'extraction des composés phénoliques. L'autre partie restante de chaque plante a été conservé sans broyage pour l'extraction des huiles essentielle.

II. 3. Quelques tests phytochimiques des composés phénoliques

Afin d'avoir une idée sur les principes actifs présents dans les espèces choisies pour cette étude, la partie aérienne choisie pour l'extraction, a subi des tests phytochimiques afin de confirmer l'existence des composés phénoliques.

II. 3. 1. Tanins

Une masse arbitraire de la poudre de chaque plante, est macéré dans un volume d'éthanol pendant 24 H à l'obscurité. Après filtration, quelques gouttes de FeCl₃ sont ajoutées au filtrat. L'apparition d'une couleur verte foncé indique la présence des tanins (Surmaghi et al., 1992).

II. 3. 2. Saponines

Une masse arbitraire de la poudre de chaque plante a été chauffée dans de l'eau distillée jusqu'à ébullition, après refroidissement, le mélange a été filtré et vigoureusement agité, l'apparition d'une mousse stables de hauteur supérieur à 1 cm après 15 min indique la présence des saponines (Mojab et al., 2003).

II. 3. 3. Flavonoïdes

Une masse arbitraire de la poudre de chaque plante a été macérée dans le méthanol pendant 24H, un volume d'AlCl₃ a été ajouté à un certain volume du filtrat. L'apparition d'une couleur jaune foncé indique la présence des flavonoïdes (Quettier, 2000).

II. 4. Préparation des extraits

II. 4. 1. Extraction des composés phénoliques

La présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques hydroxylés chez tous les composés phénoliques, est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir du matériel végétale, les caractériser chimiquement et les doser. Cependant, il faut noter que ces propriétés peuvent s'exprimer différemment selon la complexité de la molécule concernée et le nombre de groupements hydroxyles portés par chacun des cycles benzéniques. (Macheix et al., 2005).

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

La plupart des composés phénols, peuvent aisément être extraits avec des mélanges méthanol/eau (80/20, v/v). Après l'élimination de l'alcool par évaporation sous vide, il est ensuite nécessaire de purifier l'extrait global ainsi obtenue, d'abord en éliminant les pigments

Partie expérimentale

chlorophylliens et caroténoïdes (extraction à l'éther de pétrole), puis en extrayant les composés phénoliques avec un solvant de polarité intermédiaire comme l'acétate d'éthyle. Qu'il est ensuite aisé d'éliminer sous vide afin de transférer finalement dans le méthanol, la fraction phénolique correctement purifiée. (**Macheix et al., 2005**).

Dans la présente étude, l'extraction a été réalisée selon le protocole adapté par **Khacheba et al., 2014**, selon trois étapes : macération, dépigmentation et purification.

A. Macération

Une quantité de 5g de chaque poudre est macérée dans mélange hydro – alcoolique (méthanol-eau) (80 : 20 V/V) pendant 24 heures à température ambiante et à l'obscurité. L'extrait est filtré puis le résidu est repris pour une deuxième macération avec un autre volume du même mélange hydro-alcoolique dans les mêmes conditions.

Ce qui nous a donc permis d'obtenir l'extrait hydro-alcoolique brut.

B. Dépigmentation

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

C. Purification

La phase aqueuse ainsi obtenue est ensuite lavée une ou plusieurs fois avec un même volume d'acétate d'éthyle. Ce qui nous a permis d'avoir des fractions à priori contiennent les composés phénoliques polaires.

Les extraits organiques ainsi obtenus sont séchés avec du sodium anhydre puis évaporés à sec à pression réduite à 50°C. Les extraits phénoliques ainsi obtenus présentent généralement un aspect visqueux, de couleur verte, jaune ou marron. Les résidus sec sont repris dans 10 ml de méthanol pur donnant la fraction phénolique correctement purifiée et conservée au réfrigérateur jusqu'à leur analyse.

II. 4. 2. Extraction des huiles essentielle

50 g la partie aérienne de chaque plante, est été macéré dans de l'eau distillée, dans un ballon de capacité de deux litres, toute une nuit. L'ensemble est placé dans l'appareil de Clevenger et porté à ébullition à l'aide d'un chauffe-ballons. En traversant un réfrigérant, les vapeurs chargées d'huile se condensent et décantent ; l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.

Les huiles obtenues, sont mesurées (en μl par g de plante) et les avoir récupérées, elles sont conservées, dans des tubes en verre bien scellés et recouverts d'aluminium, au réfrigérateur à 4°C et à l'abri de la lumière (protection contre la chaleur, l'évaporation et la lumière).

II. 5. Dosage des composés phénoliques

II. 5. 1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode adaptée de **Singleton et Ross (1965)** avec le réactif de Folin-Ciocalteu commercial. Le réactif est formé d'acide phosphotungestique $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $\text{H}_3\text{PM}_{12}\text{O}_{40}$, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (**Chavez, 1996**).

Pour réaliser le dosage, 100 μl de chaque extrait dilué à différentes concentrations sont mélangés à 500 μl du réactif de folin-Ciocalteu. Après deux minutes d'incubation, 2 ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 sont ajouté. Les tubes sont ensuite agités et placés à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution préparée est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de type Shimadzu 1601, à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc. Les valeurs de l'absorbance sont proportionnelles à la quantité de polyphénols présente dans nos extraits. Et les résultats sont présenté en **mg équivalent d'acide gallique/g** de matière sèche.

II. 5. 2. Dosages des flavonoïdes

Les teneurs des flavonoïdes ont été mesurés par une méthode adaptée de **Lamaison et Carnat (1991)** en utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl₃) comme réactif.

Pour réaliser le dosage, 1 ml de chaque solution diluée a été mélangés à 1 ml d'AlCl₃ puis incubé à la température ambiante pendant 20 minutes. 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 sont proportionnelles à la quantité de flavonoïdes présente dans nos extraits. Et les résultats sont présentés en mg équivalent quercétine /g de matière sèche.

II. 6. Effet d'inhibition des plantes sur l' α – amylase

Dans la présente étude, on s'intéresse à l'évaluation de l'effet des composés phénoliques et des huiles essentielles des plantes investiguées sur l'activité enzymatique de l' α – amylase fongique d'*Aspergillus oryzae*.

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 favorables.

II. 6. 1. Principe de la méthode de dosage par le DNS

L'activité enzymatique de l' α – amylase est dosée sur son substrat l'amidon (mélange de 2 homopolymères, l'amylose et l'amylopectine composés d'unités de molécules de D-Glucose). Elle catalyse l'hydrolyse de ce substrat qui libère le maltose et d'autres produits (**Figure1**). Le maltose libéré est dosé spectrophotométriquement.

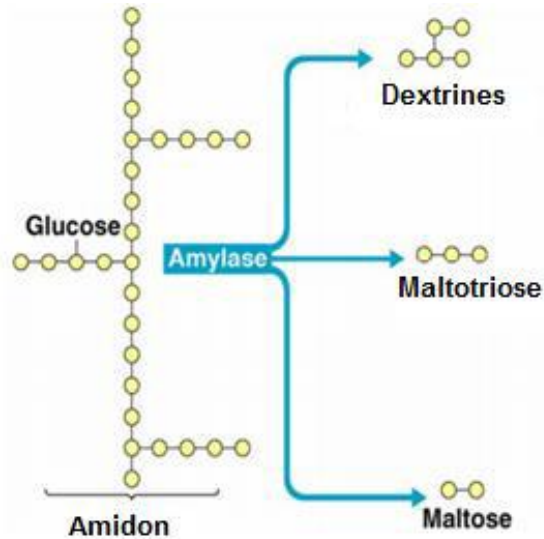


Figure 1. Produits de dégradation de l'amidon par l' α – amylase

La méthode est basée sur le dinitrosalicylique (DNS, phénol cristallin, sulfite de sodium, hydroxyde de sodium et double tartarate) qui stoppe la réaction enzymatique par un changement de pH et forme un complexe avec le glucose.

Cette méthode teste la présence d'un groupe carbonyle libre ($C = O$) des sucres dits réducteurs (**figure1**). Ceci implique l'oxydation du groupe fonctionnel présent dans le glucose, Simultanément, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) est réduit à l'acide 5-nitrosalicylique 3-amino dans des conditions alcalines (**Miller, 1956**).

Chaque molécule de maltose (une liaison hydrolysée) libérée dans le milieu réactionnel, réagit avec le DNS en excès de couleur orange entraînant une réduction de ce dernier, induisant en parallèle un changement de couleur en rouge brique dont l'intensité est mesurée après dilution à 540 nm.

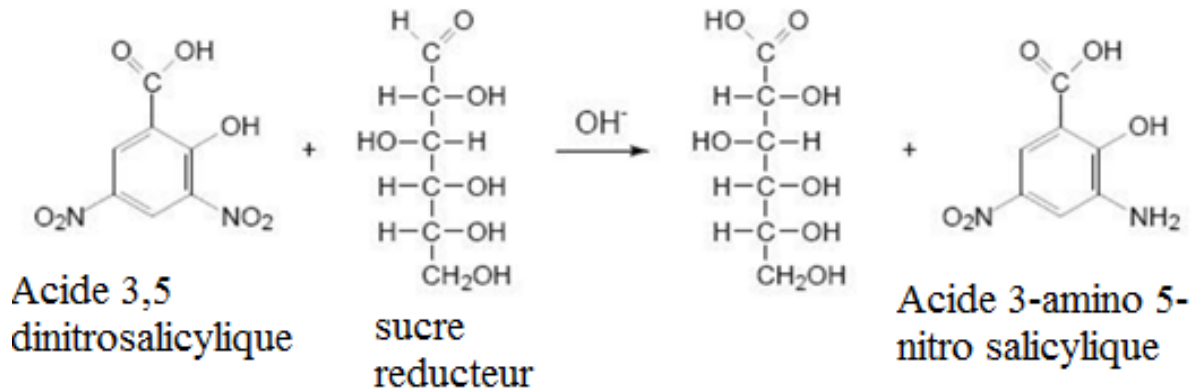


Figure 2. La réaction du réactif DNS avec un sucre réducteur (Castellucci, 2013).

II. 6. 2. Test d'inhibition

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 atteindre.

A. Extraits phénoliques

Dans des tubes à essai les milieux réactionnels contenaient 200 μl du tampon phosphate, 100 μl d'amidon, 100 μl de chaque extrait phénolique dilué à la même concentration dans du tampon phosphate salé (pH 6,9), et au temps zéro 100 μl d' α - amylase débute la réaction pour une incubation pendant une durée de 5 min à 37 °C. La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout du DNS, le milieu réactionnel est ensuite porté à ébullition à 100 °C pendant 10 min, après refroidissement le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau distillée. Les absorbances sont ensuite mesurées à 450 nm avec le même spectrophotomètre.

Un contrôle a été préparé de la même façon sans inhibiteur.

Partie expérimentale

Les pourcentages d'inhibition sont calculés selon la relation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon du test}}{A \text{ contrôle}} \times 100$$

A control: Absorbance du contrôle sans inhibiteur.

A échantillon du test : Absorbance de l'échantillon du test.

B. Huiles essentielles

Dans des tubes à essai, les milieux réactionnels contenaient 100 µl de chaque huiles essentielles dilués à la même concentration dans du tampon phosphate salé (pH 6,9) et 100 µl d' α – amylase. Les tubes sont ensuite incubés pendant 10 min à 37 °C, il s'en suit l'ajout de 100 µl du substrat pour débiter la réaction suivie d'une incubation pendant une durée de 10 min. La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout du DNS, le milieu réactionnel est ensuite porté à ébullition à 100 °C pendant 5 min, après refroidissement le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau distillée. Les absorbances sont ensuite mesurées à 540 nm avec le même spectrophotomètre.

Un contrôle a été préparé de la même façon sans inhibiteur.

Les pourcentages d'inhibition sont calculés selon la relation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon du test}}{A \text{ contrôle}} \times 100$$

A control: Absorbance du contrôle sans inhibiteur.

A échantillon du test : Absorbance de l'échantillon du test.

II. 6. 3. Étude du pouvoir anti-amylasique

L'activité inhibitrice confirmée par le test précédant, nous avons encouragés de procéder à l'étude de l'activité anti – amylasique en vue de déterminer pour chaque extrait le paramètre IC50.

Partie expérimentale

Pour cela, nous avons varié la concentration en extraits. L'activité inhibitrice des extraits est mesurée comme décrit précédemment en introduisant 100 μ l des différentes concentrations variables d'extraits.

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

Résultats et discussions

Résultats et discussions

III . 1. les tests phytochimiques

Avant d'entreprendre toute tentative d'extraction et d'étude, nous avons établis des tests phytochimiques sur les différentes plantes choisis pour l'étude, pour avoir une idée sur les métabolites secondaires existant.

Les résultats des trois tests phytochimiques réalisés sur la poudre de toute la partie aérienne de chaque plante, ont montré qu'elle contient des flavonoïdes, des tanins et des saponines et donc, la plante peut être considérée comme source de composés phénoliques et de saponines. Les résultats sont consignés dans **le tableau 3**.

Tableau 3. Résultats des tests phytochimiques sur les plantes étudiées.

	Les flavonoïdes	Les tanins	Les saponines
<i>Ajuga iva</i>	++	+++	++
<i>Ocimum bacilicum</i>	++	+++	-
<i>Marrubium vulgare</i>	+	+	+
<i>Matricaria pubescens</i>	++	+++	-
<i>Salvia officinalis feuilles</i>	++	+++	++
<i>Salvia officinalis fleurs</i>	++	+++	-

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

(-) : absence de métabolite, (+) : présence de métabolite en faible quantité, (++) : Présence de métabolite en quantité moyenne, (+++) : Présence métabolite en quantité importante.

Au regard du tableau précédent, nous remarquons qu'il y a pratiquement la même présence en flavonoïdes chez toute les plantes excepté la plante *Marrubium vulgare* dont la présence est très faible et les fleurs de la plante *Salvia officinalis fleurs* dont la présence est très importante. Cette différence est due aux conditions climatiques dans lesquelles ont pucées les plantes, on peut dire que la plante *Salvia officinalis* a pucé dans des conditions la sécheresse du sol, la salinité, les rayant UV et la température qui font que la présence en flavonoïdes est importante (**Ramakrishna et Ravishankar., 2011**). De plus Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction.

Résultats et discussions

Alors que la plante a pu pousser dans des conditions climatiques ne favorisant pas la synthèse des flavonoïdes.

Quant aux tanins, toutes les plantes ont présenté une très forte présence hormis la plante *Marrubium vulgare* dont la présence est faible. Les tanins sont un groupe de métabolites secondaires qui sont synthétisés dans de nombreuses espèces de plantes supérieures, et qui semblent être fortement influencés par les facteurs environnementaux sous l'angle de ces deux facteurs quantitatifs et qualitatifs tels que la saisonnalité, les attaques d'insectes, la pollution de l'air, et la disponibilité de l'eau et des nutriments (macro et micronutriments). Ceux-ci semblent influencer directement sur la composition chimique et plus précisément la teneur en tanin présent dans les plantes, ce qui peut s'expliquer par le fait que la production de ces composés est liée à un type de réponse chimique de la plante à l'environnement (**Sampaio et al., 2011**).

Seulement trois échantillons parmi les six ont montrés la présence de saponines dont la plus forte est enregistrée pour la plante *Ajuga iva*. Les saponines sont abondantes dans diverses espèces végétales et dans certains animaux marins. Chez les plantes, les saponines se trouvent surtout chez les angiospermes, mais ils sont également trouvés dans certaines fougères. Les saponines se produisent dans diverses parties de la plante, y compris les racines, les feuilles, les tiges, les bulbes, les fleurs et les fruits. Le contenu de saponines est très élevé dans certaines plantes (**Szakiel et al., 2011**). Cependant, comme dans le cas des autres catégories de métabolites secondaires, le niveau de ces composés peut être fortement influencé par beaucoup de facteurs intrinsèques et externes. Les facteurs intrinsèques reflètent l'état physiologique de la plante, qui dépend principalement de stade de croissance et de développement. Les facteurs externes comprennent les effets de l'environnement, à la fois abiotiques et biotiques (la température, la fertilité des sols, la disponibilité de l'eau et de la lumière) (**Szakiel et al., 2011**). On peut envisager donc, que la synthèse des saponines n'a pas été influencé par ces facteurs.

Résultats et discussions

III . 2. Préparation des extraits

La partie aérienne de chaque plante choisi pour l'étude, a subit le même traitement de séchage et de conservation. Dans cette étude nous nous sommes intéressait à deux métabolites secondaire (les composés phénoliques et les huiles essentielles) vue les multitudes d'activité biologiques qu'ils confèrent.

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée par macération hydro – alcoolique, quant aux huiles essentielles elles ont été extraites par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif Clevenger. Les teneurs, les aspects et les couleurs de chaque extrait bruts sont consigné dans le (Tableau 4).

Tableau 4 . Teneurs, aspect et couleurs des extraits des plantes étudiées.

Plantes	Teneurs % en composés phénoliques			Teneurs en % en huiles essentielles		
	Aspect	Couleur	Teneur (%)	Aspect	Couleur	Teneur (%)
<i>Ajuga iva</i>	Visqueux	Vert militaire	3,88	-	-	-
<i>Ocimum bacilicum</i>	Visqueux	Vert militaire	3,40	Liquide	Transparent	0,66
<i>Marrubium vulgare</i>	Visqueux	Marron	14,14	-	-	-
<i>Matricaria pubescens</i>	Visqueux	Marron	3.7	Visqueux	Orange	0,13
<i>Salvia officinalis</i> (feuilles)	Visqueux	Vert olive	3,89	Liquide	Jaune clair	0.68
<i>Salvia officinalis</i> (fleurs)	Visqueux	Jaune	4.05			

Tous les extraits ont montré différentes couleurs qui sont fonction de la composition et des aspects visqueux excepté deux extraits d'huiles essentielles des plantes *Ocimum bacilicum* *Salvia officinalis* qui sont liquides.

L'extraction est la séparation des parties actives des plantes à l'aide de solvants sélectifs par des procédures standards. Les produits ainsi obtenus à partir de plantes sont des mélanges relativement complexes de métabolites, en état liquide, ou semi-solide sous forme de poudre sèche (après élimination du solvant). Au cours de l'extraction, les solvants se diffusent dans le matériel végétal solide et solubilisent les composés à polarité similaire. Ces produits

Résultats et discussions

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**).

Les méthodes d'extraction utilisées en pharmaceutique, implique la séparation des parties médicalement actives des tissus végétaux à partir des composants inactifs / inertes en utilisant des solvants sélectifs. Lors de l'extraction, les solvants se diffusent dans la matière végétale solide et solubilisent les composés de polarité similaire (**Tiwari et al., 2011**).

D'après les résultats du **tableau 4**, on remarque que les teneurs en composés phénoliques ont varié entre 3.70 % (*Ocimum bacilicum*) et 14.14% (*Marrubium vulgare*). La plus part de nos plantes n'ont pas atteint 10%. Ces faibles valeurs sont influencées par plusieurs paramètres qui sont : la partie de la plante utilisée comme matériau de départ, le solvant utilisé pour l'extraction, la procédure d'extraction. Aussi la différence de granulométrie ne permet pas le même contact du solvant avec la poudre végétal (**Tiwari et al., 2011**).

De plus, la différence d'espèces (familles) ainsi que les régions de récolte dont les conditions climatiques et environnementales non identiques peuvent également expliquer cette variabilité.

Suite à l'extraction des huiles essentielles, permis cinq plantes étudiée seulement trois plantes (*Salvia officinalis*, *Matricaria pubescens* et *Ocimum bacilicum*) ont montré l'existence d'huiles essentielles avec des teneurs différentes, dont la plus faible est enregistrée pour la plante *Matricaria pubescens* (0,13 %), et la plus forte par la plante *Salvia officinalis* (0,68 %).

Nous avons remarqué que les deux plantes *Salvia officinalis* et *Ocimum bacilicum* ont des teneurs très proches et importante par rapport à la plante *Matricaria pubescens* ceci peut être expliqué le fait que ces deux plantes appartiennent à la famille des lamiacées qui sont connues par leur richesse en huiles essentielles (**Agostini et al.,2009**).

Si on compare entre les teneurs en composés phénoliques et les teneurs en huiles essentielles, nous remarquons que les plantes sont plus riches en composés phénoliques qu'en huiles essentielles. On peut envisagé, que ces plantes ont pucé dans des conditions environnementales désagréables favorisant ainsi la synthèse des composés phénoliques, mais n'ayant aucune influence sur la synthèse des huiles essentielles vue qu'elles ne sont pas

Résultats et discussions

synthétisées à des fins de défense et de protection mais afin de produire une odeur attrayante pour certains animaux et insectes, en aidant à la pollinisation. Dans d'autres cas, le parfum est nocive, agissant comme un répulsif; ou irritants, fonctionnant également comme un répulsif. Les huiles jouent un rôle pour sceller des plaies, comme vernis pour empêcher l'évaporation de l'eau (**Werker, 2006 ; Saeb et Gholamrezaee., 2012 ; Koul *et al.*, 2008**).

N'écartant pas aussi que les deux modes d'extraction utilisés dans cette étude pour extraire les composés phénoliques et les huiles essentielles sont différents. Les techniques générales de l'extraction à partir d'une plante comprennent la macération, l'infusion, la percolation, la digestion, l'extraction hydro-alcoolique, l'extraction à contre-courant, l'extraction par micro-ondes, l'extraction à ultrasons (sonication) et l'extraction par fluide supercritique.

Pour les plantes aromatiques, les techniques d'hydrodistillation (distillation aqueuse, distillation à la vapeur, distillation aqueuse et à la vapeur), macération hydrolytique suivie d'une distillation, peuvent être employés. Certaines des dernières méthodes d'extraction des plantes aromatiques comprennent micro-extraction en phase solide, l'extraction de protoplastes, microdistillation, thermomicrodistillation et distillation moléculaire.

Les variations de différentes méthodes d'extraction qui affectent la quantité et la composition des métabolites secondaires d'un extrait dépendent : du type d'extraction, du temps de l'extraction, de la température, de la nature du solvant et de la polarité (**Tiwari *et al.*, 2011**).

En conclusion, on peut dire qu'aucune procédure standard d'extraction ne peut conduire à la récupération de tous les composés phytochimiques présents dans une plante. Mais des efforts devraient être faits, pour produire des procédés de qualité aussi cohérente que possible (dans la fourchette la plus étroite possible), pour développer et pour choisir les meilleurs procédés d'extraction.

Résultats et discussions

III . 3. Dosage des composés phénoliques

Avant toute tentative d'étude d'activité biologique, nous avons effectué un dosage des phénols totaux sur les différents extraits préparés à partir des 5 plantes hypoglycémiantes.

Le dosage des phénols totaux a été réalisé par le réactif Folin-Ciocalteu et les teneurs ont été exprimé par mg EAG/ g de matière sèche. Quant au dosage des flavonoïdes, nous avons utilisé le trichlorure d'aluminium comme réactif et les teneurs ont été exprimé par mg ER/ g de matière sèche.

Le **tableau 5**, résume les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes pour l'extraction hydro- alcoolique de chaque plante.

Tableau 5. Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des plantes étudiées

Plantes	Teneurs en Phénols totaux (mg EAG / g MS)	Teneurs en flavonoïdes (mg ER/g MS)
<i>Ajuga iva</i>	0.57 ± 0.00	0.51 ± 0.00
<i>Ocimum bacilicum</i>	7.13 ± 0.00	6.52 ± 0.00
<i>Marrubium vulgare</i>	2.36 ± 0.00	1.37 ± 0.00
<i>Matricaria pubescens</i>	2.95 ± 0.00	Non déterminé
<i>Salvia officinalis</i> (feuilles)	9.72 ± 0.00	8.37 ± 0.00
<i>Salvia officinalis</i> (fleurs)	17.23 ± 0.00	8,42 ± 0.00

D'après la synthèse des résultats obtenus pour la quantification des composés phénoliques, on constate que les teneurs en phénols totaux ont varié entre 75,0 et 17,23 mg EAG/g MS, et pour le dosage des flavonoïdes, les teneurs ont varié entre 0,51 et 8,42 mg ER/g de MS.

Les fleurs et les feuilles de plante *Salvia officinalis* ont enregistré les meilleurs teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes par rapport aux autres plantes, on peut dire que cette plante est riche en composés phénoliques et ces différences de teneurs entre les plantes étudiées peuvent être attribuées à plusieurs facteurs : le type de contact solvant - matière végétale et le type et le degré de polymérisation des composés phénoliques (structure). De plus le réactif Folin Ciocalteu utilisé pour le dosage des phénols totaux est un réactif très sensible mais malheureusement peu spécifique car beaucoup d'autres composés réducteurs peuvent interférer, avec d'autres composés que les polyphénols telles que les sucres, les protéines et les pigments qu'on estime ont pu passer dans le mélange polaire Méthanol/eau utilisé pour l'extraction (Luís *et al.*,2010).

Résultats et discussions

Si on compare les valeurs des teneurs en flavonoïdes à celles des teneurs en composés phénoliques, on remarque qu'elles sont toutes inférieures à ces dernières, ce qui indique que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possédant autres structures chimiques que celles des flavonoïdes (Acide phénoliques, tanins, stilbènes...). Une plante a montré sa richesse en flavonoïdes à savoir *Salvia officinalis* : 8,37 feuilles et 8,42 (fleurs) mg ER /g MS

De plus nous remarquons que les teneurs en phénols et en flavonoïdes sont très proches ce qui peut être expliqué par le fait que presque tous les phénols extrait sont des flavonoïdes, excepté les fleurs de la plante *Salvia officinalis* dont la teneur en phénols est très élevé par rapport aux flavonoïdes qui est due sûrement à la non spécificité du réactif.

Les fleurs de la plante *Salvia officinalis* on présentée des teneurs en phénols totaux et flavonoïdes supérieures aux feuilles, ceci peut être dû à la partie utilisée de la plante ; cette différence d'inégale de répartition des flavonoïdes pourrait s'expliquer par le fait que les fleurs sont plus riche en flavonoïdes totaux, suivies des feuilles et des racines, puis des fruits et enfin de l'écorce ; car elle sont plus exposées à l'ensoleillement solaire que les autres organes de la plante. En effet, les flavonoïdes assurent la protection des tissus de la plante contre les effets nocifs du rayonnement solaire (**Hugues et al., 2011; Dohou et al., 2003**) De plus les fleurs sont riches en enzymes impliqué dans la synthèse des flavonoïdes (**Harborne, 1980**).

Il faut noter que les teneurs en extraits bruts et en phénols totaux ne varient pas dans le même sens, car on remarque que pour des teneurs élevées en extraits brut on enregistre des quantités faibles en phénols totaux. Cette constatation est valable pratiquement pour toutes les plantes et notamment dans les plantes *Ajuga iva* et *Marrubium vulgare* car ces plantes ont enregistré la valeur la plus élevée en extrait brut alors que ce n'est pas le cas pour les teneurs en phénols totaux.

Des études réalisées au laboratoire des sciences fondamentales sur d'autres espèces végétales de la région de Laghouat ont été utilisées la même procédure d'extraction réalisée dans notre étude excepté l'extraction liquide - liquide où il ont utilisé du dichlorométhane et de l'acétate d'éthyle ont montré des teneurs en phénols inférieures que celles observées chez nos plantes (**Khacheba et al., 2014**) (2). Par contre une autre étude (**Khacheba et al., aout**

Résultats et discussions

2014 (1) sur les mêmes espèces végétales de la région de Laghouat ayant utilisé une extraction aqueuse a montré des teneurs très proches que celles qu'on a enregistré. Ces valeurs chez nos plantes peuvent être liées à la richesse de nos plantes en polyphénols.

III . 4. Effet d'inhibition des cinq plantes sur l' α – amylase

III . 4. 1. Test d'inhibition

En vue de repérer les extraits ayant une capacité inhibitrice vis-à-vis de l' α – amylase, nous avons soumis ces derniers des tests d'inhibitions *in vitro* à la même concentration. Les taux d'inhibition obtenus sont résumés dans le **tableau 6**.

Tableau 6. Taux d'inhibition des extraits phénoliques et des huiles essentielles des plantes étudiées vis - à vis de l' α – amylase.

Plantes	Les pourcentages d'inhibition (%)	
	Les composés phénoliques	Les huiles essentielles
<i>Ajuga iva</i>	36,12 \pm 0,11	-
<i>Ocimum bacilicum</i>	63,21 \pm 2,02	12,76 \pm 1,63
<i>Marrubium vulgare</i>	20,75 \pm 0.62	-
<i>Matricaria pubescens</i>	43.92 \pm 3,38	55,10 \pm 2,13
<i>Salvia officinalis</i> (feuilles)	54.02 \pm 2,34	31.98 \pm 0,81
<i>Salvia officinalis</i> (fleurs)	55,95 \pm 2,68	(Partie aérienne)

Suite aux résultats des tests d'inhibition, nous avons constaté que tous les extraits préparés présentent un potentiel d'inhibition vis-à-vis de l' α – amylase à différents taux d'inhibition.

Les valeurs calculées pour les composés phénoliques, sont comprises entre 36,12 et 63,21 %. Les meilleurs pourcentages d'inhibition sont enregistrés pour les extraits de la plante *Ocimum bacilicum* (63,21 %) et la plante *Salvia officinalis* : 55,95 et 54.02 % pour les fleurs et les feuilles respectivement. Quant aux autres plantes les pourcentages d'inhibitions sont < à 55%. Quant aux valeurs calculées pour les huiles essentielles sont comprises entre 12,76 et 55,10 %. Le meilleur pourcentage d'inhibition est celui de l'huile de *Matricaria pubescens* (55,10 %.).

Cette constatation peut être expliquée par le fait que la composition et les structures chimiques des molécules inhibitrice présentent dans les deux extrait phénoliques et huiles

Résultats et discussions

essentielles varient avec l'espèce, ce qui mène à différents contacts avec le site actif de l'enzyme, ce qui prouve que la composition et la structure jouent un rôle important dans l'inhibition (**Heo et al., 2009**).

Cependant, on peut déduire que l'effet inhibiteur de cette enzyme par nos extraits, implique probablement la présence des groupements glucosidiques dans les squelettes phénoliques et / ou flavonoïdiques et terpénoides.

Des études récentes ont démontré que les groupes hydroxyle de composés polyphénoliques ont un rôle important dans la promotion de l'activité inhibitrice (**Heo et al., 2009**). D'autres études ont prouvé l'effet inhibiteur de l' α – amylase par les terpénoides présents dans des extraits phénoliques ou dans des huiles essentielles (**Michelle de Sales et al., 2012; Guessan et al., 2011; Békro, 2011**). Il a été également démontré que la baisse de l'activité enzymatique dépend de la concentration ainsi que du nombre et de la position des groupes hydroxyles des composés. Ces activités inhibitrices dépendent de la structure des composés réagissant avec les protéines / enzymes et de diverses propriétés des biopolymères tels que le poids moléculaire, la solubilité et la digestibilité *in vitro*. Le mode d'inhibition dépend également de la spécificité du substrat à l'enzyme (**Chethan et al., 2008**).

Les pourcentages d'inhibition les plus importants n'ont pas atteint les 100 % et comme le phénomène d'inhibition est le résultat d'une synergie entre plusieurs molécules on peut expliquer ces taux par la séparation de certaines molécules dans deux solvants d'extraction qui auraient pu donner des taux plus importants si ils étaient présents ensemble dans le même milieu réactionnel (**Ranga et al., 2009**).

III . 4. 2. Étude du pouvoir anti-amylasique

Après avoir confirmé l'existence d'activité inhibitrice pour chaque extrait par le test précédent, et on se basant sur les résultats, trois plantes ont été choisies pour procéder à l'étude de l'activité anti – amylase ; afin de déterminer pour chaque extrait et dans les mêmes conditions réactionnelles le paramètre IC₅₀ qui représente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse réactionnelle jusqu'à 50% de sa valeur maximale non – inhibée.

Résultats et discussions

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

Les représentations graphiques de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en extraits, nous ont permis de déterminer les valeurs d'IC₅₀ pour chaque extrait que nous avons regroupés dans le **tableau 7** si dessous :

Tableau 1. Valeurs des IC₅₀ des extraits des plantes sélectionnées vis - à vis de l' α - amylase

Plantes	Les IC ₅₀ (mg/ml)	
	Les composés phénoliques	Les huiles essentielles
<i>Ajuga iva</i>	11,49 \pm 0,07	-
<i>Ocimum bacilicum</i>	6,00 \pm 0,01	88,98 \pm 1,24
<i>Marrubium vulgare</i>	58,79 \pm 0,05	-
<i>Matricaria pubescens</i>	10,80 \pm 0,90	26,41 \pm 0,30
<i>Salvia officinalis</i> (feuilles)	8,14 \pm 0,54	63,76 \pm 0,22
<i>Salvia officinalis</i> (fleurs)	6,89 \pm 0,96	

Les valeurs d'IC₅₀, ont variée globalement entre 6,00 et 58,79 mg/ml pour les extraits phénoliques et entre 26,41 et 63,76 mg/ml pour les extraits d'huiles essentielles.

Les extraits phénoliques ont enregistré de meilleurs IC₅₀ par rapport aux extraits d'huiles essentielles ceci, peut être attribuée à la présence d'un groupes de molécules phénoliques dont la structure est différente que celles des molécules existant dans les huiles essentielles leurs conférant une activité inhibitrice plus efficace.

Nous avons constaté un résultat très intéressant concernant les plantes, *Ocimum bacilicum* et fleurs de *Salvia officinalis*, pour les composés phénoliques et de *Matricaria pubescens* pour les huiles essentielles. Ces dernières ont montré un bon inhibiteur car elle a enregistré les plus

Résultats et discussions

faibles valeurs d'IC50 : 6,00 et 6,89 mg/ml respectivement ceci peut être expliqué par la richesse de ces plantes en molécules spécifiques qui sont responsable de l'inhibition de l' α -amylase.

*Conclusion
générale*

conclusion

Des extraits de plantes, ont longtemps été employés pour le traitement du diabète dans divers systèmes de médecine. Ils sont actuellement reconnus, comme une nouvelle alternative pour une thérapie diabétique notamment comme inhibiteur de l'activité de l' α – amylase. L'inhibition par les composés phénoliques (flavonoïdes) et les huiles essentielles a été rapportée.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à cinq plantes à savoir : *Ajuga iva*, *Ocimum*

bacilicum, *Marrubium vulgare*, *Matricaria pubescens* et *Salvia officinalis* (feuilles et fleurs), dont le choix s'est fondé sur leurs importances en thérapeutique traditionnelle locale comme antidiabétiques et sur le fait qu'elles ont déjà fait l'objet d'étude pour leurs activités inhibitrices vis-à-vis de l' α -amylase dans le laboratoire des sciences fondamentales.

- Dans un premier temps, nous avons extrait les composés phénoliques pour les cinq plantes par macération hydro – alcoolique et les huiles essentielles de seulement trois plantes (*Ocimum bacilicum*, *Matricaria pubescens* et *Salvia officinalis*) par hydrodistillation.
- Dans un second lieu, nous avons procédé à la quantification des composés phénoliques par des méthodes spectrophotométrique. Le dosage des phénols totaux a été réalisé par la méthode de folin –Ciocalteu, en utilisant l'acide gallique comme étalon. Tandis que l'évaluation des composés flavonoïdiques par rapport à la rutine a été effectuée par dosage complexométrique avec le trichlorure d'aluminium.

Les résultats montrent clairement que les teneurs en phénols totaux varient entre 0,57 et 17,23 mg/g équivalent en acide gallique. L'analyse quantitative du contenu en flavonoïdes nous a conforté dans l'idée que ces plantes étaient en possession d'un matériel riche en flavonoïdes et dont les valeurs sont comprises entre 0,51 et 8,42 mg/g équivalent en rutine.

Les résultats des tests d'inhibition, ont montré que tous les extraits, ont un effet inhibiteur vis-à-vis de l' α – amylase avec des valeurs de pourcentages d'inhibitions allant de 36,12 et 63,21 %

conclusion

pour les extraits phénoliques et de 12,76 à 55,10 % pour les extraits d'huiles essentielles.

Nous avons pu mettre en évidence pour la première fois in vitro, l'effet inhibiteur des huiles essentielles des trois plantes (*Ocimum bacilicum*, *Matricaria pubescens* et *Salvia officinalis*) sur l' α - amylase dont les valeurs de constantes d'inhibition (IC_{50}) sont comprises entre 26,41 et 63,76 mg/g.

Les résultats d' IC_{50} obtenu, indiquent que ces plantes peuvent être investiguées à des fins pharmacothérapeutiques, et notamment, les extraits phénoliques des plantes *Ocimum bacilicum* et *Salvia officinalis*, qui ont présenté les plus faibles valeurs de constante d'inhibition 6,00 et 6,89 mg/g respectivement.

L'ensemble de ce travail a permis de mieux connaître l'intérêt de ces plantes vis-à-vis leur activité anti-amylasique, ce qui nous encourage à approfondir la recherche pour caractériser les molécules responsables de cette inhibition par la combinaison des techniques chromatographiques et spectroscopiques.

De même, il est envisageable d'élargir le panel des tests d'inhibition, en utilisant d'autres substrats ou d'autres types d'enzymes. Il reste encore d'autres plantes locales utiles qui n'ont pas été analysées et qui mériteraient de déterminer leur potentialité dans le domaine étudié.

Ce travail a fourni de nouvelles connaissances ethnopharmacologiques et phytochimiques au sujet des plantes antidiabétiques et a permis de mettre en évidence le rôle des polyphénols naturels et des huiles essentielles dans la normalisation des troubles glycémiques.

*Références
bibliographiques*

Les references bibliographiques :

- **Abderrahmane, M., 2008.** Séminaire Agriculture, environnement et santé S. N. A. E. S. 159 – 165.
- **Agostini, F., Atti dos Santos, A- C., Rossato, M., Pansera, M. R., Luciana dos Santos, P., Atti Serafini, L., Molon, R et Moyna, P., Mar/Apr. 2009.** Essential oil yield and composition of Lamiaceae species growing in southern Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology.Vol.52.
algérien, Edition Dar Elhouda, p 30.
- **Annie Fleuriet, J-J. M et Jay-Allemand, C., 2005.** les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, ©presses polytechniques et universitaires romandes, p 19-21.
Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils.©Elsevier B.V.
- **Bailey C.J et Day C., 1989.** Traditional plant medicines as treatment for diabetes. Diabetes Care. Vol 12.
- **Bakkali, F., Averbeck S et Averbeck, D., 2008.** Review MI-Biological effects of
- **Bastard, J.P et Hainque, B., 1995.** Mécanismes d'action cellulaire de l'insuline et insulino-résistance périphérique. Sang Thromb Vaiss, 7 : 365.
- **Bastard, J.P., Vigouroux C et Capeau, J., 2001.** Syndrome métabolique ou syndrome d'insulinorésistance. Encycl Méd Chir, Endocrinologie-Nutrition. 10-363-A-10: 1-7.
- **Békro, M et Békro Y-A., 2011.** Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. Revue de génie industriel. Vol 6, 55-61.
- **Békro., 2011.** Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. Revue de Génie Industriel. Vol 6, 55-61.
- **Beloued, A., Jan 2003.** Les plantes médicinales d'algerie, Edition : 2. 01. 4267. Alger. ©Office des Publications Universitaires.

Les references bibliographiques :

- **Bezić, N., Dunkić, V et Vuko-A, E., 2013.** Activity of Essential Oils of Some Lamiaceae Species and Their Most Important Compounds on CMV and TMV. science, technology and education© FORMATEX.
- **Bhandari, M. R., Jong-Anurakkn, N., Hong, G et Kawabata, j., 2008.** α - Glucosidase and α - amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia Ciliata*, Haw.). Journal of Food chemistry. 247 – 252.
- **Boulanouar, B ., Abdelaziz, G., Aazza, S ., Gagob, C., Grac, M et Miguelb., 2013.**
- **Castellucci, F. 2013.** Détermination de l'activité β -glucanase (β 1-3, β 1-6) dans les préparations enzymatiques. © OIV 2013.
- **Chehma, A. avril 2006.** Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional
- **Chethan, S., Sreerama, Y-N et Malleshi, N-G., March 2008.** Mode of inhibition of composés phénoliques de quelques plantes de la région de Beni – Djellil, université.
- **Da Silva ,S -M., Koehnlein, E. A., Bracht, A., Castoldi, R., Rodrigues de Morais, G., Baesso, M. L., Peralta R. A., Marques de Souza, C. G., de Sá-Nakanishi A. B et Peralta ,R. M., 2014.** Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. Food Research International, vol 56.
- **Djelili, F., Madani, K et Chibane, M., 2008.** Extraction et analyse quantitative de
- **Dohou, N., Yamni, K., AHROU CH, S. T., RISSI HASSANI, L .M -ID., BADOUC, A et GMIR, A-N.,2003.** Screening Phytochimique D'une Endémique Ibéro-Marocaine, *Thymelaea Lythroides*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 2003, 142, 61-78.
- **Fernandez, X et Chemat, F., octobre 2012.** La chimie des huiles essentielles, © Vuibert - 5 allée de la 2^e DB, 75015 Paris.
- **Fett-Neto, A- G.,2010.** Plant Secondary Metabolism Engineering. Brazil, Humain Press. finger millet malt amylases by the millet phenolics. Journal of Food Chemistry. Vol 111, 187-191.
- **Giner- Chavez, B.I., 1996.** Condensed tannins in tropical forages. these Ph. D, Cornell University, Ithaca, USA .

Les references bibliographiques :

- **Giraud, N ., Pradere , F., Chevalet, P et Soubaya, T., 2010.** Biologie licence. Paris. © Martin Valigursky/Fotolia.
- **Guessan, A, H, O., DagoDéliko, C, E., Mamyrbékova-Békro J, A et Yves-Alain.**
- **Heo, S - J, Hwang, J – Y., Choi, J –I., Han, J – S., Kim, H – J., et Jeon, Y – J., May 2009.** Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, Vol 615, p 252-256.
- **Hüsnü Can Baser, K et Buchbauer, G., 2010.** Handbook of Essential oils, Taylor and Francis Group. London New York. P 235- 256.
- Iserin, P., 2001. Larousse encyclopédie des plantes médicinales. 2nd Edition Paris, ©Larousse.
- **Jean Bruneton., 2009.** Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. ©LAVOISIER 4^e édition. Paris.
- **Kazeem M- I, Ogunbiyi J- V et Ashafa, A. O., 2013.** In vitro Studies on the Inhibition of α -Amylase and α -Glucosidase by Leaf Extracts of *Picralima nitida* (Stapf). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. Vol 12 (5),pp. 719-725.
- **Khacheba, I., Djeridane, A et Yousfi, M.,2014.** Twenty Traditional Algerian Plants Used in Diabetes Therapy as Strong Inhibitors of α -Amylase Activity. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. Vol 2014, Article ID 287281,12 pages.
- **Khacheba, I., Djeridane, A., Kameli, A et Yousfi, M.,2014.** The Inhibitory Effect of Some Algerian Plants Phenolics Extracts on the α -glucosidase and α -amylase Activities and their Antioxidant Activities. © 2014 Bentham Science Publishers. Vol. 10, No. 1.
- **Khalfa, S., 2009.** Le diabète sucré, 3^{ème} Edition, Alger, © office des publications universitaires, pp 3-23.
- **Koul,O., Walia, S; et Dhaliwal, G. S., 2008.** Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopesticides International*. Vol. 4.
- **Leland, J., cseke., Kirakosyan, A., Peter, B., Kaufman, S- L., Warber, J- A., duke, H., Brielmann, L. 2006** .Natural products from plants, 2^e Edition, London New York © 2006 by Taylor & Francis Group..

Les references bibliographiques :

- **Magalhães, L- M., Santos, F., Segundo, M- A., Reis, S et Lima J- L.F.C., Oct. 2010.** Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. journal homepage:www.elsevier.com/locate/talanta, vol 441–447.
- **Marles R.J et Farnsworth N.R., 1995.**Antidiabetic plants and their active constituents. Phytomedicine 2.
- **Miller, G- L., 1956.** Analytical Chemistry.Pioneering Research Division, Quarfermasfer Research and Engineering Center, Natick, Mass.
- **Mojab, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N et Vahidipour, H. R., 2003.** Phytochemical Screening of Some Species of Iranian Plants. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, p 77 82.
- **Naczka, M et Shahidi, F., 2004.** Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, volume1054 , page 95–111.
- **Nishandhini, S., Sudha, V., Mallavarapu, G- R et Murugan, R., 2015.** Chemical Compositions, α -amylase Inhibitory and Antioxidant Activities of the essential oils from unripe fruit pulp and leaves of syzygium cumini. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Volume 7.
- **Passa, P., Robert, J.J., Polonsky, K.S., Froguel, P., 1996.** Clinical phenotypes, insulin secretion and insulin sensitivity in kindreds with maternally inherited diabetes and deafness due to mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene mutation. Diabetes; 45(4).
- **Pierre, J., 2006.** LE LAROUSSE MEDICAL, 4^e Edition- Paris. ©LAROUSSE 2006.
- **Pillon, F., TAN, K., Jouty, P et Frullani, Y., Décembre 2014.** Le traitement médicamenteux du diabète de type 2, © 2014 Elsevier Masson SAS. p 24.
- **Prudhomme, ch., 2008.** diabétologie, endocrinologie, métabolisme. 2^e titrage Paris, Edition Maloine.
- **Quettier Deleu, C., 2000.** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat hulls and flour, Journal of Ethnopharmacology, volume 72, pp 35 - 42.
- **Ramakrishna, A et Ravishankar, G, A ., Nov 2011.** Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling & Behavior. V.6(11).
- **Rutter ,G.A., 2000.** Diabetes: The importance of the liver Curr. Biol.10: R736-R738. (PubMed).

Les references bibliographiques :

- **Saeb, K et Gholamrezaee, S., 2012.** Variation of essential oil composition of *Melissa officinalis* L. leaves during different stages of plant growth. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* . Volume 2.
- **Sales, P- M ., Monteiro de Souza, P., Simeoni, L- A., Pérola de Magalhães, O et Silveira, D., Janvier 2012.** α -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source, *J Pharm Pharmaceut Sci. Brazil*. Vol; 15(1) ; 141 – 183.
- **Sales, P- M , Monteiro de Souza, P., Simeoni, L- A et Magalhães, P- O, Dâmaris., 2011.** Silveira α -Amylase Inhibitors. *J Pharm Pharmaceut Sci*. Vol 15(1) 141 – 183.
- **Sampaio, B. L., Bara, M. T. F., Ferri, P. H., Santos, S. d C., de Paula, J. R., 2011.** Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol 21, No 6).
- **Schauenberg, P., 1977.** Guide des plantes médicinales. Paris, Delachaux et Neistlé. pp186.
- **Schauenberg, P., juin 2010.** Guide des plantes médicinales. Paris, Delachaux et Neistlé.
- **Senhaji N, et al. 2014.** Contribution a` l'étude de l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase chez des sujets atteints de diabète type 2. *Pathol Biol - Paris*.
- **Small, E et Catling, P- M. 2000.** Les cultures médicinales canadiennes . ©Conseil national de recherches Canada. Canada. 281 p.
- **Surmaghi, S. M. H., Aynehchi, Y., Amin, G. H et Mahmoodi, Z., 1992.** Survey of Iranian plants for saponins, alkaloids, flavonoids and tannins, *J. Sch. Of Pharm. Tehran Unive*, volume 2, pp 281 - 291.
- **Szakiel, A., Paczkowski, C et Henry, M., 2011.** Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochem Rev*. Vol 10, p 471 – 491.
- **Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G et Kaur, H. Jan-Mar 2011.** Phytochemical screening and Extraction, *Internationale Pharmaceutica Scientia*.
- **Werker, E., JUN 2006.** Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plans of Lamiacea—a review, *Flavour and fragrance journal*. Vol 8 Issue 5.
- **Worsztynowicza, P., Napieralaa, M., Bialas, W., Grajeka, W., Olkowicz, M., 2014.** Pancreatic α -amylase and lipase inhibitory activity of polyphenolic compounds present in

Les references bibliographiques :

the extract of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.). *Process Biochemistry*. Vol49 p 1457–1463.