

Antibiotiques Antifongiques:
physico-chimie,
synthèse et activité biologique

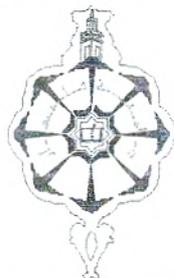
République Algérienne Démocratique et populaire

Ministère d'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen-

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'Univers

Département de Biologie



Laboratoire de recherche

« Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique »

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme

Master en biologie

Option : « Biochimie appliquée »

Thème

**Tests phytochimiques et l'effet d'extrait
hydroalcoolique brut de *Marrubium vulgare* sur
l'activité de l' α -amylase**

Présenter par :
M^{elle} NADJARI Fatima

Soutenu le 16/06/2014 devant le jury

Président : Mr RAHMOUN Nadji

M.C.B, Université de Tlemcen.

Examinatrice : M^{elle} BENARIBA Nabila

M.C.B, Université de Tlemcen.

Promoteur : Mr AZZI Rachid

M.C.B, Université de Tlemcen.

Année Universitaire : 2013/2014

DEDICACE

Je dédie cette thèse

- ♣ *A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance.*
- ♣ *A ma nièce Ritaje Khadidja*
- ♣ *A mes belles sœurs Khaoula , Fatiha, Nassira et Naima.*
- ♣ *A mes beaux frères Mohammed Abd elhadi, Ahmed et Abd elrahman .*
- ♣ *A ma grande mère Meriem*
- ♣ *A mes tantes Fadila et Zohra*
- ♣ *A mes oncles. Abd Elkrim et Abd Elkadar. Alahdj Mohammed, Alhadj Abd Elallah*
- ♣ *A chaque cousins et cousines.*
- ♣ *A toute ma famille, proche ou éloignée.*
- ♣ *A mon fiancé Abd Elssamad*
- ♣ *A mes meilleurs amis et mon groupe de travail : Bensalah Fouzia et Elalaoui Moulay Driss.*
- ♣ *A tous mes amis.*

Nadjari fatima

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur **AZZI Rachid**, maitre de conférence au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen), pour avoir accepté de diriger et de suivre ce travail avec disponibilité, patience et bienveillance.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur **RAHMOUN N**, maitre de conférence classe B au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen), je le remercie vivement pour cette marque d'intérêt et notamment de me faire l'honneur de présider mon jury.

Un grand merci à Dr **BENARIBA N** maitre de conférence classe B au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers

l'université de Tlemcen pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier Madame **BOUCHERIT OTMANI Z.**, Professeur au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen) directrice du laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité biologique.

C'est un grand merci que j'adresse à tous les membres du Laboratoire de recherche : Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique de l'Université de Tlemcen pour leur gentillesse, leur écoute et leurs conseils en particulier à Dr **BACHIRI Asma** et Melle **Belkacem N** Maîtres assistants au département de biologie.

Je remercie tout particulièrement ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes choix, et qui été présente chaque fois que cela a été nécessaire. Merci Maman, Merci Papa, Merci mes Soeurs, mes Frères. C'est avec vous que j'ai partagé mes joies, mes peines, vous m'avez soutenu grâce à votre présence, à votre sourire, à votre amitié.

المخلص

يركز هذا العمل على البحث في المختبر عن التأثير المثبط للأنزيم الالفا اميلاز بواسطة تراكيز مختلفة للمستخلص الكحولي للجزء العلوي لنبته النعناع الابيض (مريوة) و هي نبتة تستعمل لمعالجة داء السكري .

بيدا العمل في تحضير مستخلصات انتقائية من الجزء العلوي للنعناع الابيض .

اظهرت التحاليل الكيميائية النباتية وجود الالكالويد, الكومارين, السكريات الرجعية و الدباغ في مستخلصات النبتة .

الاختبارات التي اجريت في المختبر على نشاط الالفا اميلاز اظهرت ان للنبتة تأثير يعتمد على الجرعة و الية التثبيط الخلطي اللاتنافسي .

بناء على هذه النتائج نستنتج ان مستخلص النبتة لديه فعالية في تثبيط نشاط الانزيم الالفا اميلاز .

الكلمات المفتاحية : النعناع الابيض ,داء السكري ,النباتات الطبية , الالفا اميلاز,النشاط الانزيمي .

Résumé

Ce travail porte sur la recherche, *in vitro*, de l'effet inhibiteur d'enzyme α -amylase par différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique, préparé par décoction, de la partie aérienne du Marrube blanc (*Marrubium vulgare*), plante utilisée dans le traitement de diabète sucré.

Le travail est initié par une extraction sélective à partir de la partie aérienne du *Marrubium vulgare*.

L'analyse phytochimique a révélé la présence d'alcaloïdes, de coumarines, de sucres réducteurs et de tanins dans les extraits préparés de la plante.

Les testes réalisés *in vitro* sur l'activité de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* montrent que nos extraits exercent un effet inhibiteur variable dose-dépendant, et le mécanisme d'inhibition est non compétitive mixte.

En fonction de ces résultats on suggère que nos extraits peuvent exercer un effet inhibiteur *in vitro* sur l'absorption intestinale des glucides en inhibant l' α -amylase.

Mots clé : *Marrubium vulgare*, Le diabète sucré, Les plantes médicinales, l' α -amylase, inhibition, activité d' α -amylase.

Liste d'abréviations

A	Absorbance
ADA	American Diabète Association
IC₅₀	Concentration inhibitrice de 50% d'une activité
OMS	Organisation mondiale de la santé
K_m	Constante de Michaelis
PDB	Protein data base
PPARγ	Peroxisome Proliferator activated receptor gamma
S	Substrat
T_{ps}	Temps
V_i	Vitesse initiale
V_{max}	Vitesse maximale
α	Alpha

Liste de figures

Figure 1. Les principales étapes de la digestion des sucres.....	06
Figure 02 : Diagramme en ruban de structure de l' α -amylase humain présente les trois domaines (rose et gris : domaine A ;bleu : domaine B ; rouge :domaine C) avec l'ion chlorid (vert) et l'ion calcium(jaune). [PDB, 2006].....	08
Figure 03 : structure et le site catalytique de l' α -amylase crée par Ras Mol. Le site se clivage en rose un ion calcium, la sphère grise, se trouve à proximité, un ion chlorure montré la sphère verte, [PDB ,2006].....	08
Figure 4 : <i>Marrubium vulgare</i>	14
Figure 5 : Diagramme montrant les différentes préparations des extraits.....	18
Figure 6 : courbe logarithmique des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentration de l'extrait brut.....	27
Figure7 : courbe d'étalonnage de Maltose.....	28
Figure 8 : Effet de différentes concentrations d'amidon en fonction du temps sur l'activité de l' α -amylase.....	28
Figure 9: Péprésentation len double invirse de de Lineweaver et Burk ($1/V_i = f(1/[S])$) de la réaction entre l' α -amylase et différentes concentrations de l'amidon.	29
Figure 10: les quantités de maltose (mM) produites en présence de l'extrait à 8g/l en fonction du temps.....	30
Figure 11: les quantités de maltose (mM) produites en présence de l'extrait à 10g/l en fonction du temps	30
Figure 12: les quantités de maltose (mM) produites en présence del' extrait à 12g/l en fonction du temps.....	31
Figure 13: Représentation de Lineweaver et Burk ($1/V_i = f(1/[S])$) de la cinétique enzymatique en absence et présence de l'extrait brut de <i>Marrubium vulgare</i>	32

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effet de quelques plantes médicinales sur l'inhibition de quelques amylases <i>in vitro</i>	13
Tableau 2 : Préparation de la gamme d'étalonnage du maltose.....	22
Tableau 3 : Résultat des tests phytochimiques réalisés sur <i>Marrubium vulgare</i>	25
Tableau 4: effet inhibiteur des extraits de <i>Marrubium vulgare</i> sur l'activité de l' α -amylase.....	26
Tableau 5: les vitesses initiales de la réaction enzymatique à différentes concentration de l'amidon.....	29
Tableau 6: les vitesses initiales en Mm/min en présence des différentes concentrations de l'extrait.....	31
Tableau 7 : les vitesses maximales et les constantes de Michalaelis obtenues en absence et en présence de l'extrait brut.....	33

Table de matières

1^{ère} partie : Synthèse bibliographique

I. Introduction.....	1
II. Généralités sur le diabète sucré.....	3
III. Alpha amylase (α -amylase).....	6
1-Structure d' α -amylase.....	7
2-Mécanisme d'action.....	9
3-L'inhibition d' α -amylase.....	9
IV. Plantes antidiabétiques.....	10
V-Métabolisme secondaire.....	11
1-Les polyphénols.....	11
2-Les flavonoïdes.....	11
3-Les tanins	11
3.1-Les tanins hydrolysables	12
3.2-Les tanins condensés.....	12
4-Les alcaloïdes.....	12
5-Les saponosides	13
V. Plante étudiée.....	14
1-Nom scientifiques	14
2-Nom vernaculaire	14
3-Classification botanique.....	14
4-Distribution géographique	15
5-Description botanique.....	15
6-Composition chimique.....	15
7- Utilisations de la plante.....	15

2^{ème} Partie : Partie expérimentale

Matériels et méthodes.....	16
I-Etude phytochimique.....	16
1-Matériel végétal.....	16
2-Préparation des extraits	16
2.1 Décoction en milieu aqueux.....	16
2.2 Décoction en présence des solvants.....	16
2.3 Infusion en milieu aqueux.....	16
2.4 Macération en milieu aqueux.....	17
2.5 Extraction hydroalcoolique	17
3-Tests phytochimiques.....	19
3.1- Les alcaloïdes.....	19
3.2-Les tanins.....	19
3.3-Les Flavonoïdes.....	19

3.4-Les coumarines : Fluorescence UV.....	19
3.5-Stérols et triterpènes : La réaction de Liebermann Buchard.....	20
3.6-Anthraquinones libres: Réaction de Bornträger.....	20
3.7-Les composés réducteurs.....	20
3.8-Les saponines: Indice de mousse.....	20
II. Etude de l'activité biologique.....	20
1. Matériel	20
1.1- Réactif 3,5-dinitrosalicylique (DNSA.....	20
1.2- Solution de l' α -amylase.....	21
1.3- Solution de substrat.....	21
1.4- Solution d'extrait de la <i>Marrubium vulgare</i>	21
1.5- Solution de maltose.....	21
2-principe	22
3. Méthodes	22
3.1- Effet de l'extrait de <i>Marrubium vulgare</i> sur l'activité de l' α - amylase	22
3.2-la cinétique enzymatique de α -amylase en absence et présences d'inhibiteur.....	23
3.2.1- Mesure de la vitesse initiale	24
3.2.2-Détermination du paramètre cinétique de α -amylase.....	24
3.2.3-Détermination du paramètre cinétique en présence d'extrait brut.....	24
3 ^{ème} Partie Résultats et interprétation	
I. Analyses phytochimiques	25
II Analyse biologique	26
Effet de l'extrait brut hydroalcoolique de <i>Marrubium vulgare</i> sur l'activité de l' α -amylase, <i>in vitro</i>	26
1. Détermination de l'IC ₅₀ de l'enzyme l' α -amylase en présence d'extrait brut de <i>M. vulgare</i>	26
2. Etude de La cinétique enzymatique l' α -amylase	27
2.1-Courbe d'étalonnage	27
2.2-La cinétique enzymatique de l' α -amylase en absence d'inhibiteur.....	29
2.3-La cinétique enzymatique en présence de l'extrait brut de <i>M.</i> <i>vulgare</i>	30
2.4-Détermination du mécanisme d'inhibition exercé par l'extrait brut de <i>M.</i> <i>vulgare</i>	32
Discussion.....	34
Conclusion.....	36
Références bibliographiques.....	37

embryoderms
esophagus

I. Introduction :

Le diabète sucré est un problème de santé majeur présent partout dans le monde. Les études épidémiologiques ont montré qu'il touche indistinctement toutes les populations et tous les groupes d'âge [**Barceló, 1996**]. À l'échelle mondiale, le nombre de patients diabétiques est en augmentation spectaculaire ces dernières années. En 2011, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a enregistré 356 millions de diabétiques dans le monde [**OMS, 2011**].

Cours de ces dernières années, l'étude ethnobotanique des plantes utilisées comme antidiabétiques a suscité un grand intérêt. De nombreux travaux de synthèse ont été publiés dans des revues spécialisées dans le domaine des plantes médicinales et diabète (Journal of Ethnopharmacology, Phytomedicine, Phytotherapy Research, Journal of natural products, Diabetes Care, Phytothérapie, Journal of Medicinal Plants Research, Phytomedicine,...). Ils montrent le grand intérêt qui porte l'utilisation traditionnelle des plantes antidiabétiques dans le monde [**Bailey et Day, 1989 ; Ivorra et al., 1989; Rahman and Zaman, 1989; Marles et Farnsworth, 1995; Roman-Ramos et al., 1995; Grover et al., 2002 ; Soumyanath, 2006 ; Eddouks et al., 2007**].

Les informations ethnobotaniques recueillies dans plusieurs régions du monde estiment que plus de 1200 espèces végétales, soit plus de 725 genres appartenant à 183 familles sont utilisées pour leurs propriétés hypoglycémiantes et antihyperglycémiantes [**Marles et Farnsworth, 1995**].

En Algérie, comme dans tous les pays du Maghreb et les pays en voie de développement, le recours à la médecine traditionnelle est largement répandu, et plusieurs remèdes à base de plantes utilisés individuellement ou en combinaison sont recommandés pour soigner le diabète sucré [**Azzi, 2013**].

Des enquêtes ethnobotaniques récentes effectuées dans le but de répertorier les plantes médicinales antidiabétiques dans l'Ouest Algérien [**Allali et al., 2008, Azzi et al., 2012**] et l'Est Algérien [**Hamza, 2011**], soulignent l'importance qu'occupe ce patrimoine végétal dans la pharmacopée traditionnelle et surtout dans le traitement du diabète.

Une très grande variété de mécanismes est impliquée dans la baisse de l'hyperglycémie dans le sang. Ceci est dû à la grande variété de classes chimiques des constituants hypoglycémiantes provenant des plantes. Certains de ces composés se révèlent véritablement hypoglycémiantes et pourraient avoir un potentiel thérapeutique, alors que d'autres

produisent simplement une hypoglycémie comme effet parallèle de leur toxicité, particulièrement hépatique [Jarald et al., 2008].

L'activité antidiabétique des plantes peut dépendre de plusieurs mécanismes qui visent la stimulation de la sécrétion d'insuline à partir des cellules β ; la réduction de la résistance à l'insuline, l'inhibition de β -galactosidase, α -glucosidase et α -amylase ou autres [Jarald et al., 2008 ; Kashikar et Kotkar , 2011 ; Singh et al., 2012].

Marrubium vulgare L. (Lamiaceae), communément appelé «Marrîwa, merrîwut" est une plante très répandue dans la région méditerranéenne. Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour guérir une variété de maladies. vasorelaxant [El-Bardai et al., 2003]antihypertenseur [El-Bardai et al., 2004]analgésique [DeSouza et al., 1998] , anti-inflammatoire [Sahpaz et al., 2002] , et des propriétés antioxydantes [Weel et al., 1999] . M. vulgare est l'une des plantes médicinales utilisées pour le traitement du diabète sucré dans les pays du Maghreb, l'Algérie [Allali et al, 2008;.. Azzi et al., 2012] et le Maroc [Bnouham et al, 2002; Eddouks et al., 2002; Tahraoui et al., 2007] .

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation d'effets antidiabétiques et la recherche d'éventuels mécanismes d'actions des plantes médicinales utilisées traditionnellement par la population diabétique de l'Ouest algérien.

Pour cela, ce travail porte sur l'étude phytochimique et la recherche, *in vitro*, de l'effet inhibiteur d'enzyme α -amylase par différentes concentrations d'extrait hydroalcoolique brut, préparé par décoctions de la partie aérienne du Marrube blanc (*Marrubium vulgare*).

I. Généralités sur diabète sucré :

Le diabète sucré est une affection métabolique caractérisée par une augmentation du taux de glucose sanguin « hyperglycémie » qui perturbe le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Cette affection est due à une défaillance de la sécrétion d'insuline, de l'action de l'insuline ou de ces anomalies associées [Moore et al., 2004 ; Ortiz-Andrade et al., 2005 ; Wens et al., 2007].

Les expressions de diabète insulino-dépendant et non insulino-dépendant sont supprimées. Le Comité d'Experts a estimé que ces termes, sources de confusion, étaient basés sur une classification thérapeutique plutôt qu'étiologique. La nouvelle classification définit le diabète de type 1, le diabète de type 2, diabète gestationnel et le diabète secondaire [ADA , 1998 ; Buysschaert et Hermans, 1998] .

Le diabète de type 1 ou encore diabète maigre, représente 10% environ de tous les cas de diabète. C'est une maladie auto-immune détruisant les cellules β du pancréas, caractérisée par la disparition totale ou presque totale de la sécrétion d'insuline par le pancréas endocrine. Cette carence insulinique est responsable d'une augmentation inéluctable de la glycémie et d'une évolution fatale en l'absence de traitement par l'insuline [Permuter et Morin, 2002].

Le diabète de type 2 est la forme de diabète la plus répandue représentant près de 90% des cas diagnostiqués. Ce type de diabète se manifeste communément à l'âge adulte [OMS, 2002]. C'est une maladie chronique et évolutive dans le temps, caractérisé par une altération de l'insulinosécrétion et des anomalies des effets de l'insuline sur ses tissus cibles (insulino-résistance) [Drouin et al., 1999 ; Halimi et al., 1999].

Le diabète gestationnel : est la forme transitoire du diabète et disparaît dans les semaines suivant l'accouchement. Les femmes qui ont souffert du diabète gestationnel risquent davantage de développer un diabète type 2 par la suite [Naylor et al., 1997].

Le diabète secondaire c'est une forme de diabète dans laquelle une autre maladie est à la base de l'apparition du diabète, selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et l'ADA (American Diabetes Association), le diabète secondaire est lié à : une maladie du pancréas, endocrinienne, des médicaments ou composés toxiques, une anomalie d'origine génétique de l'action de l'insuline, d'autres maladies génétique (parfois) associées au diabète et un dysfonctionnement d'origine génétique des cellules β [OMS, 1999 ; ADA, 2007].

Les complications du diabète sucré sont importantes et sont de deux types : des complications aiguës qui sont très répandues chez le diabète de type 1 et d'autres chroniques qui se manifestent surtout chez le diabète de type 2 [Capet et al., 1999] :

Les complications métaboliques aiguës sont présentées par des accidents hypoglycémiques et trois complications hyperglycémiques du diabète : acidocétose diabétique, syndrome d'hyperglycémie hyperosmolaire et acidose lactique [Orban et Ichai, 2008].

Les complications chroniques du diabète sucré, aussi bien de type 1 que de type 2, comprennent deux composantes : la microangiopathie et la macroangiopathie.

Si le diabète n'est qu'un facteur de risque de la macroangiopathie, au même titre que l'hypertension artérielle, l'hyperlipidémie ou le tabagisme, la microangiopathie apparaît spécifique de l'hyperglycémie, et elle est responsable des complications dites « dégénératives » du diabète sucré. Trois tissus sont particulièrement le siège de cette microangiopathie : la rétine, le glomérule rénal et le nerf périphérique [Raccach, 2004].

Le diabète de type 1 peut être traité par la prise d'insuline, la transplantation du pancréas et par la greffe d'ilots de Langerhans. [Street, 2002; Calne, 2005 ADA, 2006].

Les traitements du diabète de type 2 sont non médicamenteux (traitement hygiéno-diététiques) et médicamenteux (antidiabétiques oraux et insulinothérapie) :

Des mesures hygiéno-diététiques (Une alimentation équilibrée et une activité physique régulière) doivent être mises en œuvre dès que l'hémoglobine glyquée (HbA_{1c}) est supérieure à 6. Une alimentation équilibrée est conseillée, avec une augmentation des apports en glucides lents et une diminution des apports en graisses saturées et des sucres rapides [ANAES, 2000]. De plus, une activité physique adaptée aux possibilités de chaque patient est recommandée chez le diabétique de type 2 car elle contribue à une amélioration de la situation métabolique (insulinosensibilité, niveau glycémique, pression artérielle, profil lipidique, etc.) et pourrait être utile pour le contrôle du poids [ANAES, 2000].

Les traitements médicamenteux de cette affection utilisent des molécules à effet antidiabétique, qui peuvent être associées entre elles (antidiabétique oraux) [Domus, 1998].

Si le traitement ne se révèle pas assez efficace, il est nécessaire d'administration de l'insuline, malgré ces effets secondaires indésirables [Edelman, 1998].

Les médicaments oraux actuellement disponibles offrent un large spectre sur le plan de leur mécanisme d'action, mais ils ont un certain nombre d'effets indésirables [Virally et al., 2007] :

Les sulfamides hypoglycémiantes : stimulent la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatique et inhibent l'efflux de potassium intracellulaire, crée une dépolarisation membranaire provoquant l'ouverture des canaux calcium voltage dépendant. C'est en définitive l'augmentation du calcium intracellulaire qui provoque la sécrétion d'insuline par le phénomène d'exocytose [Larger, 1997 ; Allain, 2000].

Les biguanides : dont la seule forme commercialisée est la metformine qui n'agit pas sur la sécrétion insulinique mais une action exclusivement extra pancréatique consiste essentiellement : une réduction de l'insulinorésistance en ralentissant la production de glycose par le foie ; une augmentation de l'utilisation périphérique du glucose par les cellules cible ; une réduction de la néoglucogenèse hépatique [Larger, 1997 ; Wens et al., 2007].

Les thiazolidinediones (TZD) -représentée par le pioglitazone et la rosiglitazone. Ils agissent comme agonistes des Recepteurs nucléaires PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma). et diminuent la quantité d'acides gras libres plasmatiques. Ils diminuent la quantité de glucose produite par le foie et rendent les cellules adipeuses plus sensibles à l'action de l'insuline [ADA 2006; Gaborit, 2008].

Les inhibiteurs d'alpha-glucosidase : atténuant la glycémie postprandiale. Par leur action directe comme agent inhibiteur des alpha glucosidases ou alpha amylases intestinales en ralentissant la digestion des polysaccharides. [Medjdoub, 2006 ;Odhav et al.,2010 ; Ferlié, 2011 ; kumar et al., 2011 ;sales et al. , 2012].

Ceci s'est avérées 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 [Kumar et al.,2011].

Malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne, les plantes médicinales trouvent encore leurs indications thérapeutique dans le traitement d'une multitude d'affections et de maladies dans les différentes sociétés et cultures [Eisenberg et al., 1993 ;De Smet,2002] .

II. Alpha amylase (α -amylase) :

Les polysaccharides et les disaccharides doivent subir une hydrolyse enzymatique pour être transformés en monosaccharides absorbables par les entérocytes.

Quant à l'amidon est ingéré, il est hydrolysé dans une proportion de 30 a 40% par l' α -amylase présente dans la salive. L'amidon résiduel est ensuite hydrolysé par l' α -amylase pancréatique en glucose et en maltose qui se transforme en glucose par les α -glucosidases (maltase et α -dextrinase) présente à la bordure en brosse des cellules intestinales. Les autres disaccharides provenant de l'alimentation seront hydrolysés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes par des enzymes spécifiques avec la formation des monosaccharides correspondantes (Figure 1) [Allannic, 1997; Meneton, 2003].

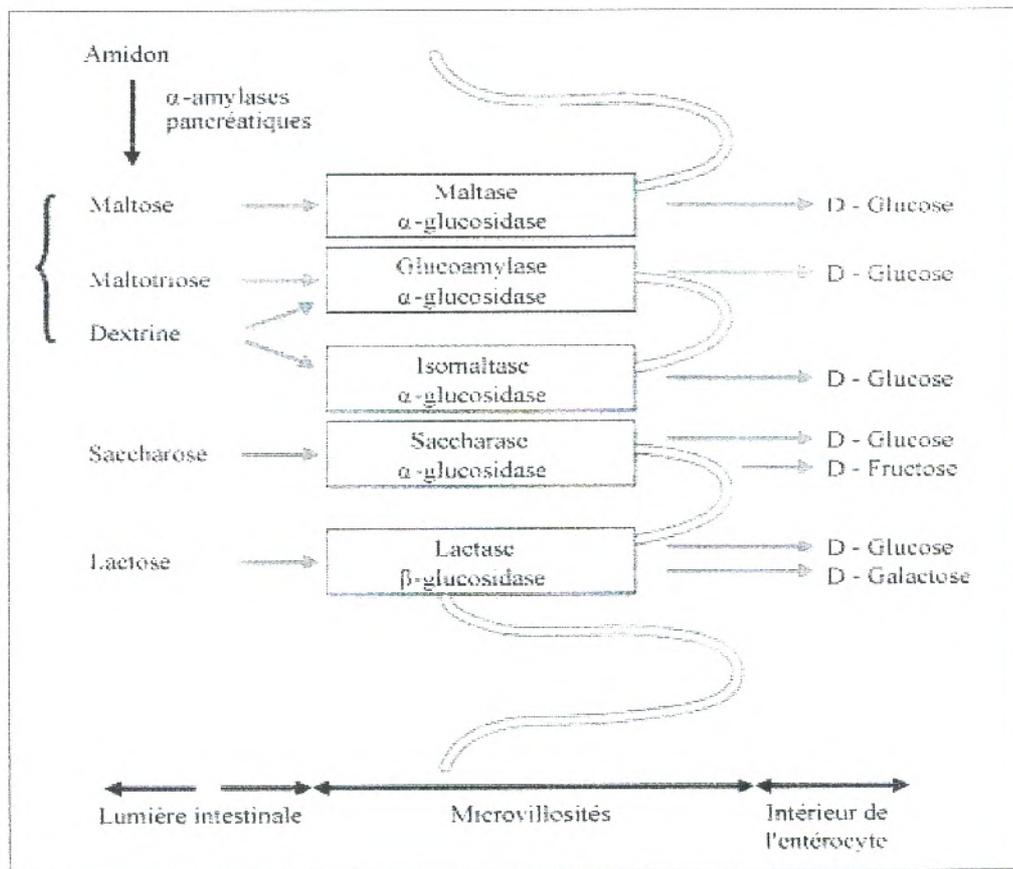


Figure 1. Les principales étapes de la digestion des sucres [Allannic, 1997].

L' α -amylase est responsable de la dégradation des glucides au niveau de l'intestin grêle. Cette dégradation permet l'absorption du glucose et fait augmenter la glycémie. De ce fait, l'inhibition de cette enzyme permet une limitation de l'augmentation de la glycémie postprandiale [Goetz, 2007].

1-Structure d' α -amylase :

Les α -amylase (1,4- α -Dglucosyl-hydrolase, E.C3.2.1.1) sont des enzymes monomériques de poids moléculaire variant entre 41 et 78 KDa, retrouvées largement chez les animaux, les plantes supérieures que chez les microorganismes. Ces enzymes hydrolysent la liaison glycosidiques α -D-(1.4) internes de l'amidon, du glycogène, des poly- et oligosaccharides apparentés. Elles sont très importantes, tant par leurs applications industrielles et biotechnologiques (biodégradation ou transformation de l'amidon, par exemple) que par leur implication dans certains troubles métaboliques (diabète sucré, obésité, ect.) faisant de ces cibles thérapeutiques. A ce jour, treize structures d' α -amylases de différents organismes ont été déposées. On dénombre ainsi cinq structures d' α -amylases de microorganismes, trois de mammifères (2 humaines et 1 porcine), un de ver, deux de champignons et deux de plantes (orge). Leurs structures tridimensionnelles ont toutes en commun un domaine catalytique central formé par un tonneau (β/α) 8 appelé aussi « TIM Barrel » [Banner et al., 1975].

Les α -amylases sont des métallo-enzymes à calcium (un ion calcium par molécule d'enzyme). Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés d'enzyme. varient d'une souche à une autre [Fogarty et al., 1980] .

Structurellement, les α -amylases sont également considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en 2 domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) et B (381-478 résidus). Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes les résidus constituant le site de fixation du substrat ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A qui montre que l' α -amylase est formée de 8 feuillets β plissés et de 8 hélices α (figure2) [Chiba, 1988 ; Burhan, 2003].

Le site actif d' α -amylase contient trois groupements d'acides aminés qui agissent ensemble pour cliver la liaison entre deux sucres dans une chaîne d'amidon, c'est le glutamate (233) et l'aspartate (197, 300). Cette structure contient une courte chaîne de cinq unités de sucre lié dans le site actif (figure3) [PDB, 2006].

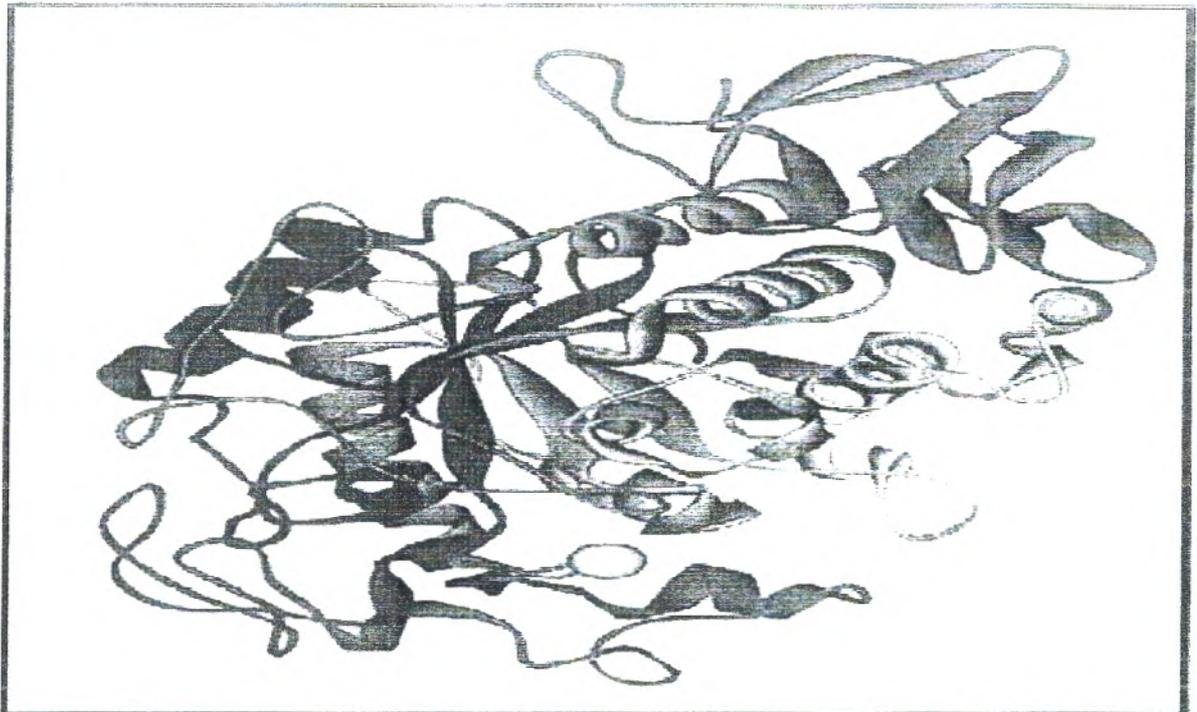


Figure 2 : Diagramme en ruban de structure de l' α -amylase humain présente les trois dommai (rose et gris: domaine A; bleu le domaine B, rouge domaine C) avec l'ion chlorid (vert) et l' calcium (jaune). (PDB,2006).

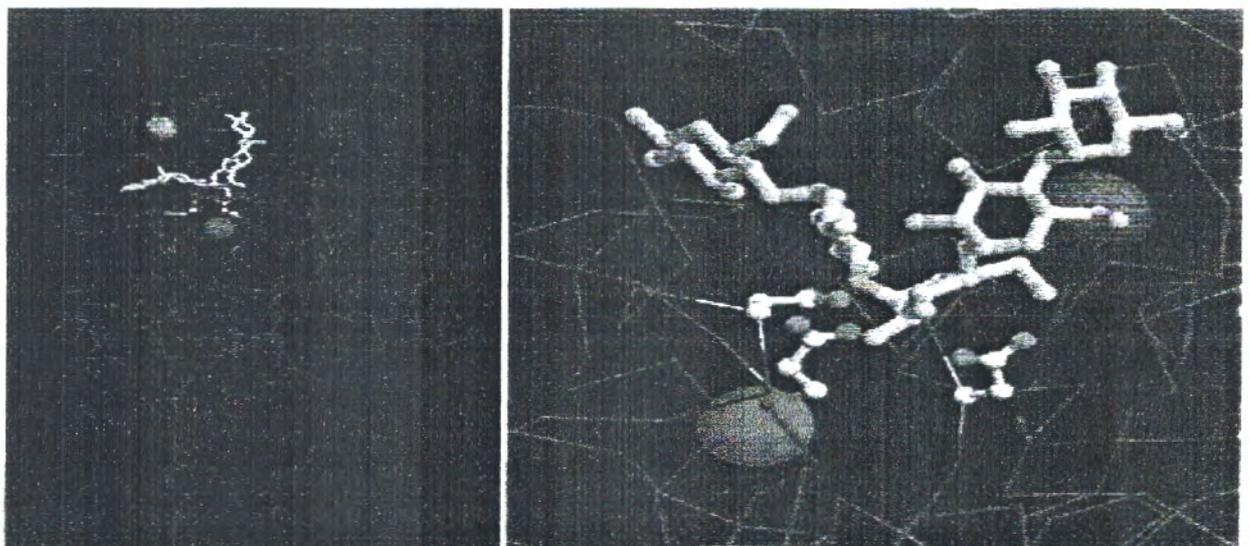


Figure 3 structure et le site catalytique de l' α -amylase crée par RasMol. Le site de clivage en rose. Un ion calcium, la sphère grise, se trouve à proximité, un ion chlorure montré la sphère verte, (PDB, 2006).

2-Mécanisme d'action :

Le mécanisme d'action de l' α -amylase nécessite la participation de 3 fonctions du site actif impliquant une attaque nucléophile, un stabilisateur de la charge positif de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé. Ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'électrons et protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat [Parks et al., 1997]. Ce mécanisme est caractéristique de l'enzyme dans les conditions expérimentales telle que la T° et le pH. [Berry et Paterson, 1990].

3-L'inhibition d' α -amylase :

L'inhibition des α -amylases induit l'intolérance des carbohydrates, la satiété et la perte de poids, prolongent le vide gastrique. Ils ont ainsi un potentiel thérapeutique pour le traitement de l'obésité et du diabète de type 2 [Gerrard et al., 2000]. Les niveaux de glucose des diabétiques peuvent être contrôlés après des repas par l'administration d'un inhibiteur d' α -amylase tel que l'acarbose. C'est un pseudo- tétrasaccharide qui a une forme proche de celle des oligosaccharides issus de la digestion de l'amidon. Il peut ainsi se lier aux sites des α -glucosidases de la bordure en brosse intestinale et α -amylase pancréatique, inhiber puissamment, de façon compétitive et dose-dépendante [Scheen et al.,2002].

Il est intéressant que certains plantes qui ont une activité inhibitrice enzymatique incluse les composés poly phénolique et glyco-protéique [Tundis et al.,2010]. Comme les anthocyanines et ellagitannins présent dans la framboise et les fraises sont des inhibiteurs de l'activité d' α -glucosidase et α -amylase, respectivement. [Mcdougall et al., 2005].

III. Plantes antidiabétiques :

Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Elles sont utilisées pour prévenir, soigner ou soulager divers maux [Farnsworth *et al.*, 1986]. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées dans le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par l'être humain [Elqaj *et al.*, 2007].

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, depuis XVIIIème siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent, on considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs d'extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels.

Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes [Iserin *et al.*, 2001].

L'approche ethnopharmacologique est d'une grande importance dans ce domaine. Elle permet de recenser les remèdes antidiabétiques et de constituer une base de données de plantes médicinales afin de conserver un savoir ancestral qui s'appuie essentiellement sur une tradition orale. De plus, l'ethnopharmacologie peut conduire à la découverte de nouveaux médicaments pour le traitement du diabète. De nombreuses plantes sont considérées traditionnellement comme antidiabétiques, certaines sont à l'origine de la mise au point de médicaments tel que la metformine grâce à *Galega officinalis* [Oubré *et al.*, 1997 ; Grover *et al.*, 2002].

Ces plantes peuvent intervenir dans différents mécanismes d'action afin de réduire les désordres métabolique liée au diabète : réduction de la résistance à l'insuline ; la stimulation de la sécrétion d'insuline à partir des cellules β ou/et inhibition du processus de dégradation de l'insuline ; l'apport de quelques éléments nécessaires comme le Calcium, le Zinc, le Magnésium, le Manganèse et le Cuivre pour les cellules β ; la régénération ou/et réparation des cellules pancréatiques β lésées ; l'effet protecteur de la destruction des cellules β ; l'augmentation le nombre de cellules β dans les îlots de Langerhans; l'inhibition de β -galactosidase, α -glucosidase et α -amylase ; prévention du stress oxydatif, qui peut être

impliqué dans le dysfonctionnement des cellules β [Jarald et al., 2008 ; Kashikar et Kotkar , 2011 ; Singh et al., 2012].

IV. Métabolisme secondaire :

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base (acides nucléiques, lipides, protéines, acides aminés et glucides). Les plantes produisent, en plus, un grand nombre de composés qui ne sont pas issus directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés métabolites secondaires [Mohammedi ,2013].

De nos jours, un grand nombre de ces composés sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci le sont selon leur usage traditionnel. Nous citerons ci-dessous quelques importants groupes phytochimiques, source de molécules biologiquement actives.

1-Les polyphénols :

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est il directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside, etc... [Bruneton, 1999 ; Lugasi et al ., 2003].

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus [Lugasi et al ., 2003].

Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les coumarines [King et Young., 1999; Tapiero et al., 2002].

Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits [Boizot et Charpe , 2006].

2-Les flavonoïdes : désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols [Seyoum et al., 2006], ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides [Ghestem et al., 2001; Bruneton, 1999].

3-Les tanins : Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est lié à

leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da [Paris et Hurabielle., 1981].

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les fagacée, les rosacée [Ghesterm et al., 2001].

Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines [Khanbabae et Ree , 2001].

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents [Bruneton, 1999].

3.1-Les tanins hydrolysables : sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques, et les tanins ellagiques [Paris et Hurabielle., 1981].

3.2-Les tanins condensés : sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine [Khanbabaea et Ree., 2001]. Les tanins condensés sont des molécules non hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre [Paris et Hurabielle , 1981].

4-Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine naturelle, le plus souvent végétales, azotés, basiques, douées, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées [Paris et Hurabielle, 1981].

Les alcaloïdes sont des composés présents essentiellement chez les Angiospermes (peu nombreux chez les Monocotylédones et très répandus chez les Dicotylédones). Ils sont exceptionnels chez les bactéries, assez rares chez les champignons, existent chez les animaux et se trouvent également chez les organismes marins (les éponges) [Bruneton, 1999].

Ce sont des composés à caractère basique; ils donnent des sels avec les acides minéraux (Chlorhydrates, sulfates, nitrates, ...) ou organiques (tartrates, sulfamates, maléates,...).

Leur solubilité dans les différents solvants varie en fonction du pH. Sous forme de bases ils sont solubles dans les solvants organiques non polaires (benzène, éther, éthylique,

chloroforme, chlorure de méthylène,...), soluble dans les alcools de titre élevé et insoluble ou très peu soluble dans l'eau. Au contraire, les sels d'alcaloïdes sont insolubles dans les solvants organiques apolaires et solubles dans les solvants organiques polaires et dans l'eau [Paris et Hurabielle, 1981 ; Bruneton, 1999].

5-Les saponosides :

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives. Ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes.

Les saponosides peuvent être classés en deux groupes selon la nature de leur génine: saponosides à génine stéroïdiques et saponosides à génine triterpéniques [Bruneton, 1999].

Tableau 1 : Effet de quelques plantes médicinales sur l'inhibition de quelques amylases *in vitro* :

Parties utilisées	Extraits	Effets biologiques	Références
Les fleurs de <i>punica granatum</i> (punicaceae)	L'extrait méthanolique (avec un rendement de 40%)	Cet extrait a un effet plus puissant inhibiteur car son $IC_{50}=1.8\mu\text{g/ml}$	[Ferlié.,2011]
Les feuilles de <i>Tecoma stans</i> (Bi-gnoniaceae)	L'extrait aqueux (avec un rendement de 22%)	L'extrait inhibe 20 et 55% de la production de glucose provenant des féculents à 0.2 et 1.0mg/ml.	[Aguilar- santamaria et al.,2009]
Le cortex de la racine de <i>Malmea.depressa</i> (Annonaceae).	L'extrait butanolique	$IC_{50}=21\mu\text{g/ml}$ de l'extrait a montré une activité inhibitrice plus forte que l'acarabose ($IC_{50}=128\mu\text{g/ml}$)	[Andrade cetto et al.,2008]
Feuille de <i>Cecropia obtusifolia</i> (Cecropiaceae)	L'extrait butanolique	La concentration inhibitrice de 50% de activité de l' a-glucosidase $IC_{50}=14\mu\text{g/ml}$	[Ferlié .,2011]

V. Plante étudiée :

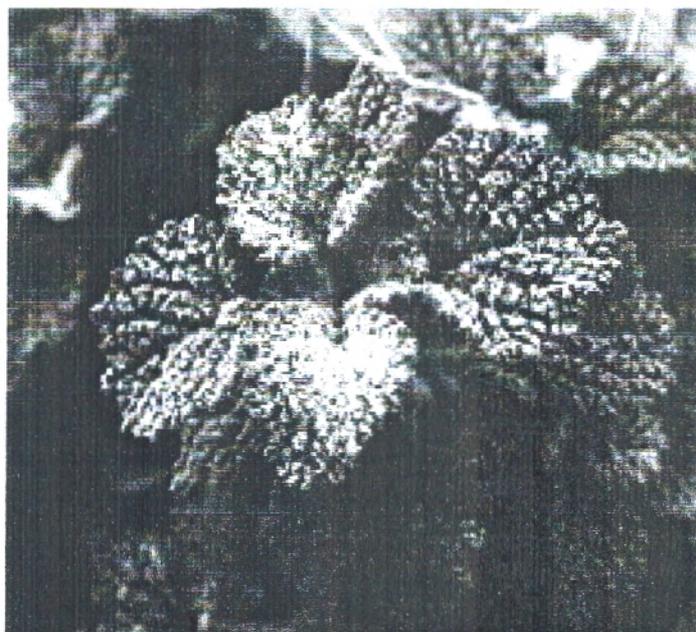


Figure 04 : *Marrubium vulgare*

1-Nom scientifiques *Marrubium vulgare* L.

2-Nom vernaculaire : En Algérie est connu par le nom Marriouth [Al kadi , 1989], au Maroc c'est Merrîwt [Novak et al ., 1966], un autre en Tunis Marroubia [Bellakhdar , 1997].

3-Classification botanique :

Règne : Plantes

Sous Règne : Tracheobiontes

Embranchement : Spermatophytes

Division : Magnoliophytes

Classe : Magnolipsides

Sous classe : Astérides

Ordre : Lamiales

Famille : lamiacées

Genre : *Marrubium*

Espèce : *vulgare*

Nom binomial : *Marrubium vulgare*

4-Distribution géographique :

Le genre *Marrubium* appartient à la famille des lamiacées, comprenant plus de 30 espèces différentes largement distribués dans les régions d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie [Boudjelal et al.,2012].

5-Description botanique

Le marrube blanc est une plante herbacée, couverte d'un duvet blanc, à tiges dressées, portant souvent de nombreuses pousses courtes et stériles, de 40 à 60 cm de long. Les feuilles sont ovales, arrondies, souvent un peu cordées à la base, feutrées à la face intérieure. Il possède de petites fleurs blanches de 12 à 15 mm de long, une corolle à deux lèvres dont l'inférieure est trilobée et la supérieure est dilobée ainsi qu'un calice à 10 dents courtes et crochues [Quezel et Santa ., 1962] .

6-Composition chimique

La partie aérienne du marrube blanc contient plusieurs métabolites secondaires tels que les diterpènes dont la marrubine responsable de la majorité des propriétés biologiques du *Marrubium vulgare* [Çitoğlu et Aksit, 2002], les flavonoïdes (apigénine et lutéoline) [Nawwar et al ., 1989], ainsi que plusieurs phénylpropanoïdes esters tels que les verbascosides [Papoutis et al .,2006].

7- Utilisations de la plante

Le marrube blanc est très utilisé en médecine traditionnelle comme expectorant, antispasmodique, antidiabétique, diurétique et en cas d'infections respiratoires. Il est aussi employé pour combattre la cellulite et l'obésité [Dellile , 2007], Plusieurs de ces utilisations traditionnelles ont été confirmés par des essais scientifiques [Masoodi M et al., 2008] ; le marrube blanc est considéré comme antidiabétique[Boudjelal et al.,2012 ; Azzi, 2014].

Matériel et méthodes

rapports

Notre étude expérimentale est réalisée au sein de laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, physico-chimie, synthèse et activité biologique », département de biologie, Faculté SNV STU, université de Tlemcen :

I. Etude phytochimique

1. Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé pour notre étude est la partie aérienne (les feuillettes et les tiges) du Marrube blanc (*Marrubium vulgare*), récolté à maturité dans mois de février dans la région de Fillaoucene, wilaya de Tlemcen .

Au laboratoire, la plante est triée, coupée et séchée à l'abri de la lumière, à une température ambiante pendant quelques semaines.

2. Préparation des extraits :

2.1 Décoction en milieu aqueux

- Mélanger 5 g du matériel végétal avec 100 ml d'eau distillée dans un ballon rodé, surmonté d'un réfrigérant;
- Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 1 heure, à l'aide d'un chauffe ballon ;
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

2.2 Décoction en milieu étheré

Des décoctions en milieu étheré (éther de pétrole) et hydroalcoolique (Méthanol/Eau : 70/30) sont préparées par le même processus et avec les mêmes quantités comme précédemment décrit avec l'eau.

Le filtrat hydroalcoolique est évaporé à sec, sous pression à une température 60°C, à l'aide d'un Rotavapor.

2.3 Infusion en milieu aqueux

- Verser 100 ml d'eau distillée bouillante sur 5 g du matériel végétal ;
- Agiter et laisser le mélange refroidir ;
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

2.4 Macération en milieu aqueux

- Macération sous agitation, à température ambiante, pendant 24 heures, de 5g du matériel végétal dans 100 ml d'eau distillée ;
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

2.5 Extraction hydroalcoolique :

Cet extrait nécessaire pour les tests biologiques est préparé comme suit :

Dans un Erlen Meyer rodé contenant 100ml d'une solution aqueuse de méthanol (30/70 :v/v) 5g de poudre fine du *Marrubium vulgare* sont ajoutés. Le mélange est porté sous reflux pendant 1h sous agitation. L'extrait obtenu est ensuite refroidi puis filtré à température ambiante, le filtrat est évaporé à 60°C à l'aide d'un rota vapeur.

A fin d'évaluation l'effet de *Marrubium vulgare* sur l'activité de l' α -amylase, l'extrait est solubilisé dans la solution du tampon phosphate (0.02M, pH6).

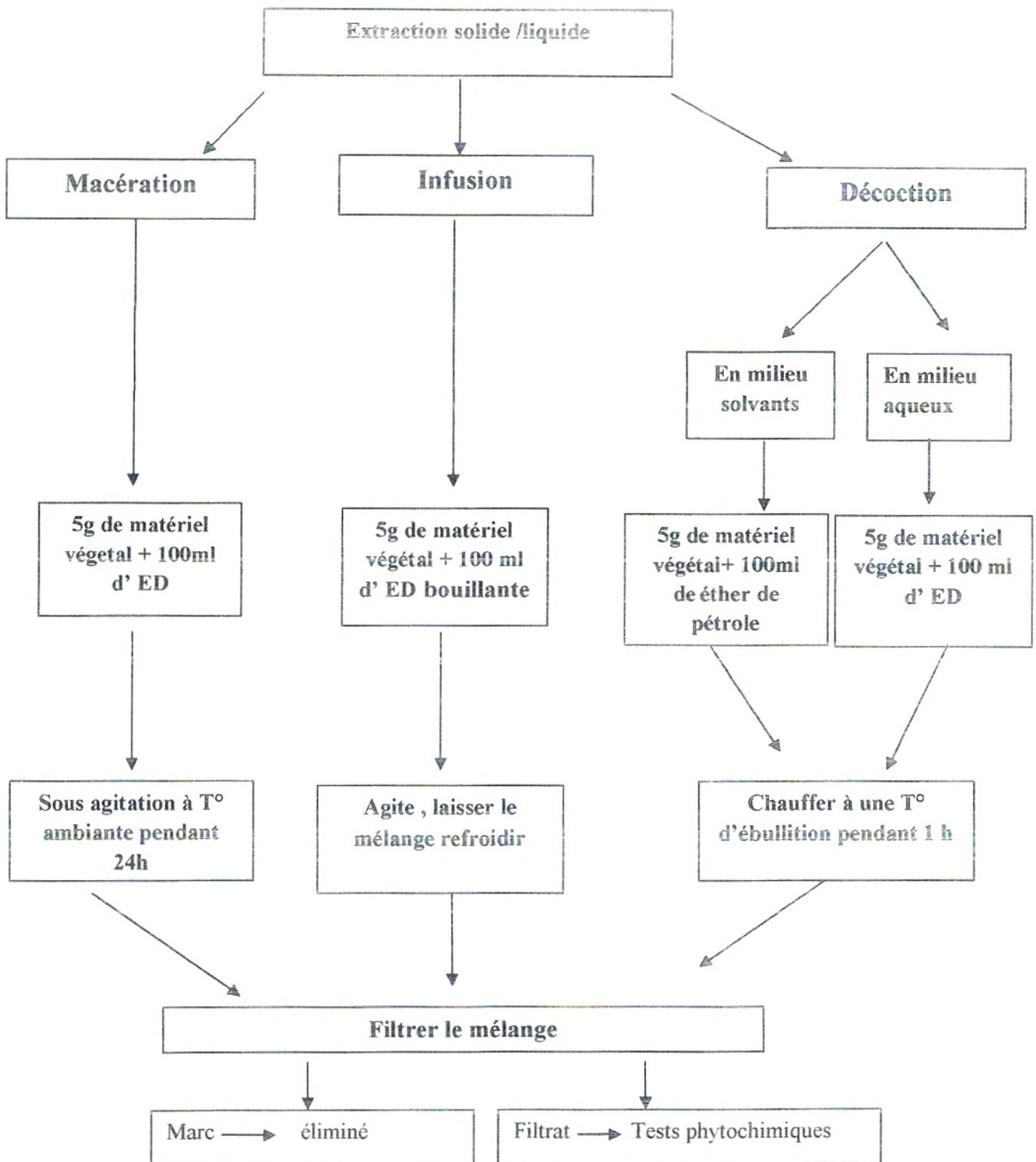


Figure 5 : Diagramme montrant les différentes préparations des extraits

3. Tests phytochimiques

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation effectuée sur les extraits préparés précédemment dans le but de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains composés chimique : les flavonoïdes, les tanins, les sucres réducteurs, les coumarines , les saponines , Stérols et triterpènes ces tests sont réalisés en présence de certains réactifs de caractérisation, selon les méthodes décrites par Harbonne, 1998.

3.1. Les alcaloïdes

Prendre 1 ml de l'extrait à analyser dans 2 tubes à essai, acidifier le milieu avec quelques gouttes d'HCl et ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube, 5 gouttes du réactif de Wagner dans le second tube , l'apparition d'un précipité blanc, brun, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes.

3.2. Les tanins

Introduire 1 ml d'extrait à analyser dans un tube à essai et ajouter quelques gouttes de solution aqueuse de $FeCl_3$ à 1 %. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre qui indique la présence des tanins catéchique ou bleu-noirâtre qui révèle l'existence des tanins gallique.

3.3. Les Flavonoïdes

A 5 ml d'extrait à tester, ajouter, 1 ml d'alcool iso amylique, quelques copeaux de magnésium et quelques gouttes d'acides chlorhydrique (HCl), l'apparition d'une coloration rose ou rouge indique la présence des flavonoïdes.

3.4. Les coumarines : Fluorescence UV

Introduire 1 ml d'extrait dans un tube, ajouter 0,5 ml de NH_4OH à 25 %. Mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

Résultats et interprétation

3.5. Stéroïls et triterpènes : La réaction de Liebermann Buchard.

Evaporer à sec 10 ml de la solution à analyser, dissoudre le résidu dans 5 ml d'anhydride acétique puis 5 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette ajouter 1 ml de H₂SO₄ concentré sur la paroi du tube sans agiter. Laisser reposer 20 minutes. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence des stéroïls et/ou des triterpènes.

3.6. Anthraquinones libres: Réaction de Bornträger

Introduire dans un tube à essais 1ml d'extrait étheré préparé et ajouter, ensuite, 1ml de NH₄OH dilué puis agiter. La coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

3.7. Les sucres réducteurs

Introduire 2 ml d'extrait aqueux dans un tube, ajouter 2 ml de liqueur de Fehling (1ml réactif A et 1ml réactif B) et incuber l'ensemble 8 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

3.8-Les saponines: indice de mousse

Introduire 1ml de chaque extrait dans un tube à essai et ajuster le volume de chaque tube à 3 ml avec de l'eau distillée. Agiter chaque tube pendant 15 secondes. Laisser reposer 15 min le résultat est positif, si la hauteur de la mousse est supérieur à 1cm.

II. Etude de l'activité biologique

Dans cette partie expérimentale nous avons étudié l'effet *in vitro* des l'extrait hydroalcoolique (méthanolique) sur activités de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*.

1. Matériel :

1.1. Réactif 3,5-dinitrosalicylique (DNSA)

Dans un Erlen Mayer, 1g de DNSA est solubilisé dans 40 ml d'eau distillée. À cette solution 30g de tartrate double de sodium et de potassium sont ajoutés sous agitation. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. L'adition de 20 ml d'une solution de NaOH

(2N) rend le réactif limpide avec une couleur orange. Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

Le réactif obtenu doit être conservé à l'abri de la lumière à +4°C.

1.2. Solution de l' α -amylase

L'enzyme utilisée est l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* (E.C.3.2.1.1) sous forme lyophilisée (Fluka). Son poids moléculaire est de 51000 Da avec une activité spécifique de 26UI/mg conservée à +4°C. L'optimum d'activité de l' α -amylase est obtenu à pH 6 et à 25°C.

Pour cela, 1g d' α -amylase est solubilisé dans 100 ml de solution tampon phosphate (0.02M, pH 6). La solution obtenue contient une activité d' α -amylase de (260 UI/ml) et à partir de cette solution mère nous avons préparé une solution dont l'activité enzymatique finale de l' α -amylase dans le milieu réactionnel est de 1.3UI/ml.

1.3. Solution de substrat

Le substrat utilisé est l'amidon soluble de pomme de terre (Merk), préparé dans la solution tampon phosphate (0.02 M, pH 6) afin de réaliser les tests sur l' α -amylase. Les concentrations utilisées dans le milieu réactionnel sont 2 ; 4 et 6 g/l.

1.4. Solution d'extrait de la *Marrubium vulgare*

Différentes concentrations d'extrait hydroalcoolique de la plante sont préparées dans la solution tampon phosphate (0.02M, pH 6) afin d'évaluer leurs effets sur l'activité de l' α -amylase. Les concentrations utilisées : 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 et 12 g/l.

1.5. Solution de maltose

A fin de déterminer la quantité de maltose produite par hydrolyse enzymatique de l'amidon, on se réfère à une courbe d'étalonnage basée sur une gamme de différentes concentrations de maltose préparées à partir d'une solution mère de maltose à 2g/l.

Tableau 2: Préparation de la gamme d'étalonnage du maltose

Tubes	1(blanc)	2	3	4	5
Solution de maltose (ml)	0	0.5	1	1.5	2
Solution de tampon phosphate (ml)	2	1.5	1	0.5	0
Volume final (ml)	2	2	2	2	2
[Maltose] Mm	0	1.4	2.9	4.3	5.8

2. Principe

Dosage des sucres réducteurs par la méthode de Bernfeld (1955)

Cette méthode est basée sur le caractère réducteur des groupements aldéhydes et cétone libre des sucres. En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation de ces fonctions provoque simultanément de la réduction l'acide 3,5-dinitrosalicylique de couleur jaune orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique de couleur rouge orange à 540 nm. L'intensité de la coloration varie selon la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel [Bernfeld, 1955].

3. Méthodes :

3.1. Effet de l'extrait de *Marrubium vulgare* sur l'activité de l' α -amylase :

On prépare une série de 6 tubes à essai pour tester l'effet, de chaque concentration d'extrait sur l'activité de l' α -amylase. Un des tubes contrôle (pour la lecture de la A_A : absorbance des tests sans extrait) et l'autre est un tube de test (pour la lecture de la A_B : absorbance des tests avec l'extrait), pour chaque tube il faut préparer un blanc dans les mêmes conditions expérimentales.

Introduire la solution de l' α -amylase (d'activité finale de 1.3 UI/ml) à 25C° tout au cours de la manipulation.

*Introduire 200 μ l de cette solution enzymatique dans tous les tubes à l'exception des tubes blancs ou ce volume est remplacé par 200 μ l de la solution tampon.

- *Ajouter 200 µl d'extrait (chaque concentration dans un tube) dans tous les tubes à l'exception les tubes contrôles ou ce volume est remplacé par 200 µl de la solution tampon.
- *Incuber tous les tubes 15 min à 25°C.
- *Introduire 200 µl de la solution d'amidon (4g/l) dans tous les tubes.
- *Incuber tous les tubes 5 min à 25 °C.
- *Introduire 600 µl de DNSA dans tous les tubes.
- *Les tubes sont agités et placés dans un bain marie bouillant en même temps et pendant 5 min à 100°C.
- *Réaliser un choc thermique en déposant les tubes directement dans un bain d'eau glacée afin de stopper la réaction entre le maltose (produit) et la réactivité DNSA.
- * Ajouter 1 ml d'eau distillée dans chaque tube, puis homogénéiser à l'aide d'un vortex.
- * Lire les absorbances contre les blancs au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540nm.
- *Calculer le pourcentage d'inhibition pour chaque extrait en utilisant la formule suivante :

$$I\% = [(A_A - A_B) / A_A] \times 100$$

I% : le pourcentage d'inhibition de l'extrait.

A_A : Absorbance du tube de contrôle (sans extrait)

A_B : Absorbance du test (avec l'extrait)

3.2. la cinétique enzymatique de α-amylase en absence et présences d'inhibiteur :

- Dans une série de tubes à essai introduit 600µl de réactif DNSA, puis 600µl du milieu à doser à différents temps : 0 ; 5 ; 10; 15 et 20min ;
- Les tubes sont agités et placés dans un bain marie bouillant en même temps pendant 10min ;

- Ils sont immédiatement refroidis dans un bain d'eau glacée afin de stopper la réaction entre le maltose et réactif DNSA ;
- ajoute 1ml d'eau distillée dans chaque tube, puis homogénéise à l'aide d'un vortex ;
- Les absorbances sont lues contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur à 540nm.

3.2.1. Mesure de la vitesse initiale :

Pour mesurer la vitesse initiale de la réaction enzymatique, il est nécessaire de mesurer la quantité de produit apparu ou le substrat disparu pendant les premières minutes de la réaction enzymatique.

Le produit formé après la réaction est le maltose (sucre réducteur formé de deux sous unités α - glucopyranose après rupture des liaisons α (1-4) glucosidiques.

la vitesse initiale de la réaction enzymatique est mesurée à partir des pentes des droites « [produit]=f (temps) » selon la formule suivante :

$$V_i = \Delta p / \Delta t$$

V_i : vitesse initiale

Δp : différence entre deux concentrations du produit formé.

Δt : différence entre deux temps de la réaction.

3.2.2. Détermination du paramètre cinétique de α -amylase :

Pour déduire les paramètres cinétique de l' α -amylase (V_{max} et K_m), nous avons utilisé la représentation en double inverse, celle de *linweaver burk* ($1/V_i = f(1/[S])$),

3.2.3. Détermination du paramètre cinétique en présence d'extrait brut :

La présence de l'extrait à différentes concentrations a pour but de déterminer :

- ✓ Les vitesses initiales (V_i) : en utilisant la représentation linéaire [produit]=f(temps) ;
- ✓ Les vitesses maximales (V_{max}) et les constantes de Michaelis (K_m) : en utilisant la représentation de *linweaver burk* ($1/V_i = f(1/[S])$).

I. Analyses phytochimiques

L'analyse phytochimique réalisée sur différents extraits de la partie aérienne (tiges, feuilles) du marrube blanc (*Marrubium vulgare*), préparés par différents mode d'extraction (décoction, macération et infusion), dans deux solvants à polarité différente (eau et éther de pétrole), a donné les résultats résumés dans le tableau 3.

Tableau 3: Résultats des tests phytochimiques réalisés sur les différentes préparations de la partie aérienne du *Marrubium vulgare* :

Métabolites secondaires	Réactifs	Décoction En milieu aqueux	Décoction Milieu étheré (éther de pétrole)	Infusion En milieu aqueux	Macération En milieu aqueux
Alcaloïdes	Mayer	+	-	-	+
	Wagner	-	-	-	-
Tanins	FeCl ₃	+++	-	+++	+
Flavonoïdes	Mg ⁺⁺	-	-	-	-
Saponines	Test de mousse	-	-	-	-
Coumarines	Fluorescence UV	++	+	-	-
Stérols et triterpènes	Réaction Liebermann Buchard	-	-	-	-
Les composés réducteurs	Liquueur de Fehling	+++	+	+++	++

(+++): Fortement présent ;(++) : Moyennement présent ;(+): Faiblement présent ;(-): test négatif

D'après les résultats obtenus, nous avons noté que la partie aérienne du (*M. vulgare*) est très riche en tanins et en composés réducteurs, qui sont présents dans les différentes préparations aqueuses.

De même, nous avons révélé la présence des coumarines dans les deux préparations par décoction et les alcaloïdes totaux, en faible quantité, dans la préparation par macération.

Les tests de recherche des flavonoïdes, des stérols et des triterpènes ont été négatifs sur nos échantillons.

Selon le mode de préparation, c'est la décoction, surtout en milieu aqueux, qui révèle la présence de plusieurs composés.

II. Analyse biologique :

Effet de l'extrait brut hydroalcoolique de *Marrubium vulgare* sur l'activité de l' α -amylase, *in vitro* :

1. Détermination de l'IC₅₀ de l'enzyme α -amylase en présence d'extrait brut de *M. vulgare*

Les extraits de la partie aérienne de *M. vulgare* exercent un effet inhibiteur variable sur l'activité de l' α -amylase, les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4: Effet inhibiteur des extraits hydroalcoolique de la partie aérienne du *M. vulgare* sur l'activité de l' α -amylase.

[Extrait]g/l	02	04	06	08	10	Contrôle
Moy A _B	0,4850	0,3857	0,3381	0,2639	0,1733	-
Moy A _A	-	-	-	-	-	0,5664
I%	14,37%	31,90%	40,30%	53,40%	69,40%	-

A_B : Absorbance d'extrait ; A_A : Absorbance de contrôle ; I% : pourcentage d'inhibition par rapport contrôle.

La concentration inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique de l' α -amylase (IC₅₀) exercée par l'extrait brut est déterminée graphiquement : Elle consiste à porter directement sur la droite de régression linéaire le pourcentage d'inhibition 50% en fonction de la concentration d'extrait en g/l (fig.6).

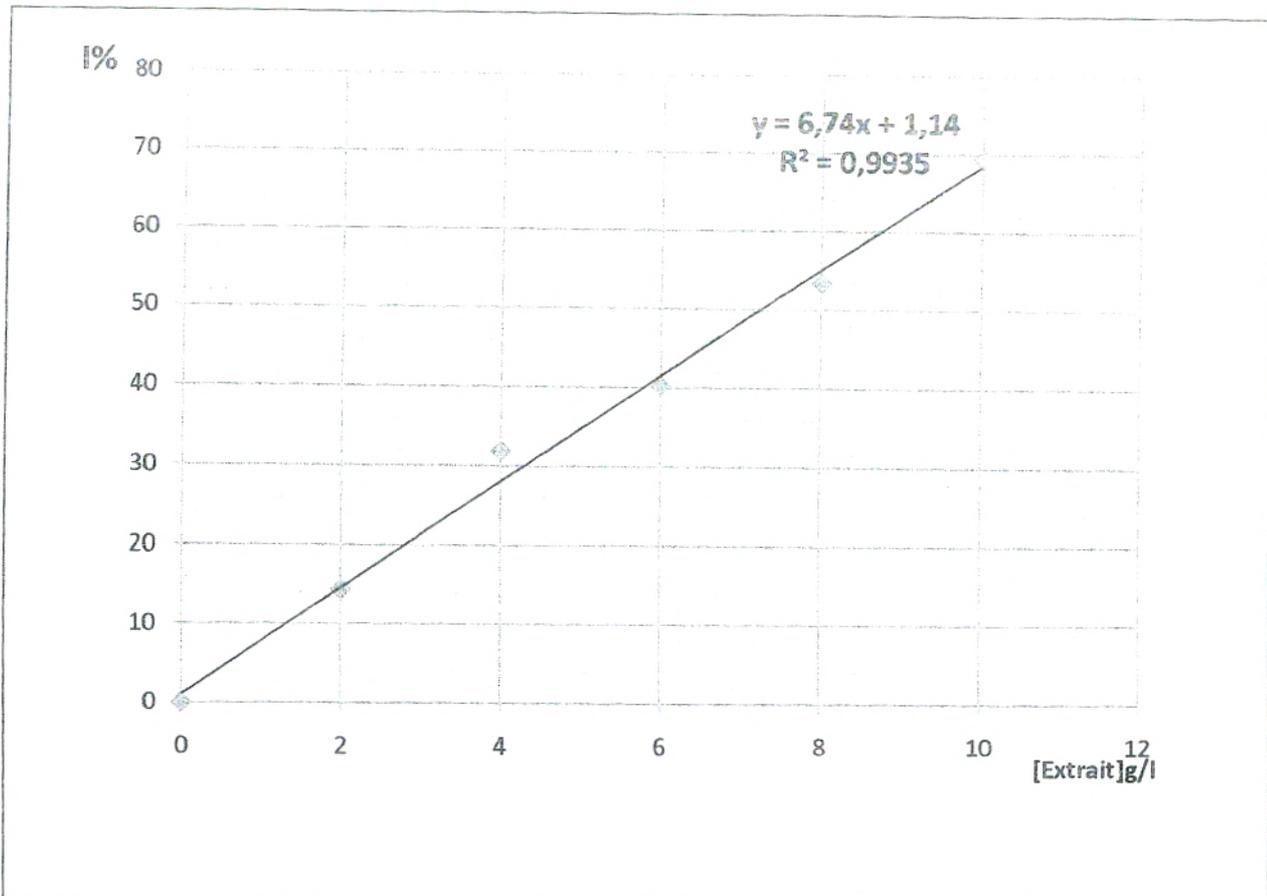


Figure 6 : Courbe des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait brut hydroalcoolique de *M. vulgare*

Selon la droite de régression linéaire présentée dans la figure 6, nous avons enregistré une IC_{50} d'ordre de 7.24g/l

2. Etude de La cinétique enzymatique α -amylase :

2.1. Courbe d'étalonnage :

La gamme d'étalonnage préparée à partir d'une solution mère de maltose à 2g/l est présentée graphiquement dans la figure 7 :

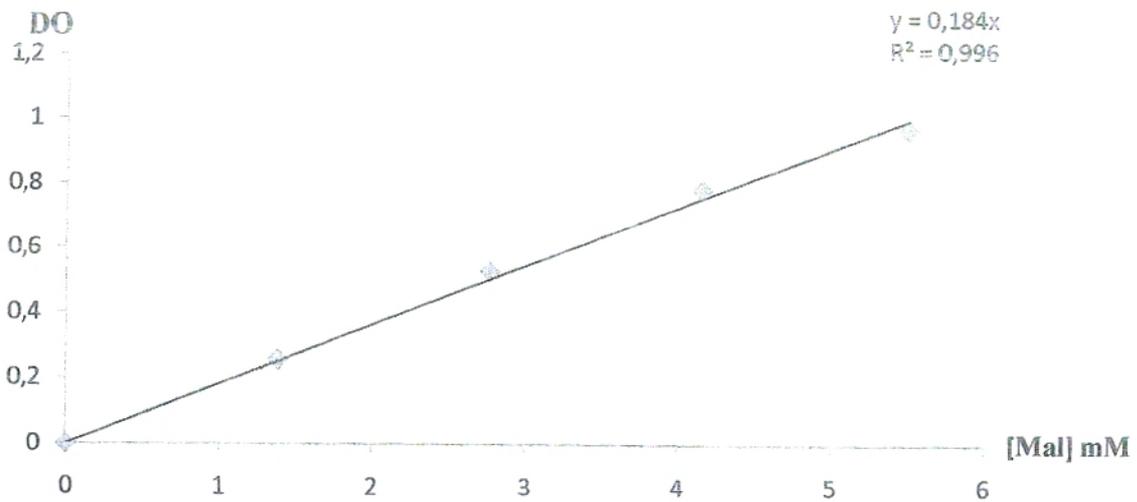


Figure 7 : Courbe d'étalonnage de Maltose à 2g/l

2.2. La cinétique enzymatique de l' α -amylase en absence d'inhibiteur :

❖ Mesure des vitesses initiales :

Pour les vitesses initiales de la réaction enzymatique, nous avons choisi différentes concentrations d'amidon 2 ; 4 et 6 g/l et une activité enzymatique finale de l' α -amylase de 1.3UI/ml .

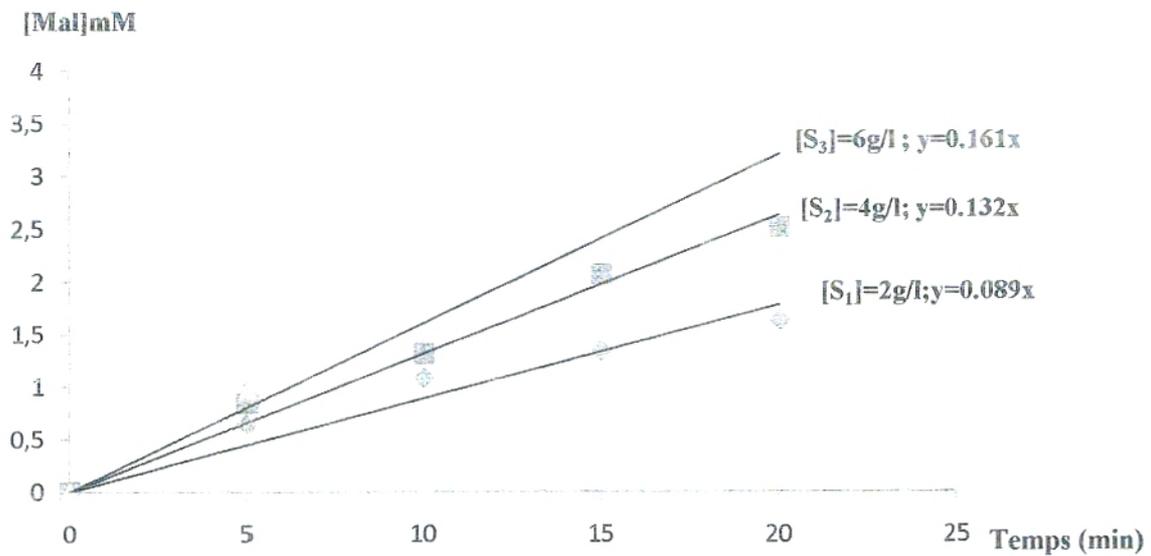


Figure 8 : Effet de différentes concentrations d'amidon en fonction du temps sur l'activité de l' α -amylase

Les pentes des droites ($\Delta p/\Delta t$) tracées à travers les points expérimentaux sont les vitesses initiales en fonction des concentrations d'amidon. Les résultats sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5: les vitesses initiales de la réaction enzymatique d' α -amylase en présence des différentes concentrations de l'amidon

[amidon]	[S ₁] =2g/l	[S ₂] =4g/l	[S ₃] =6g/l
Vitesses initiales (mM/min)	0,110	0,150	0,210

❖ Détermination des paramètres cinétiques de l' α -amylase :

Pour déterminer les paramètres cinétiques de l' α -amylase vitesse maximale (V_{max}) et constante Michalis (K_m), nous avons tracé la courbe en double inverse de *Lineweaver et Burk* ($1/V_i = f(1/[S])$) (Fig8).

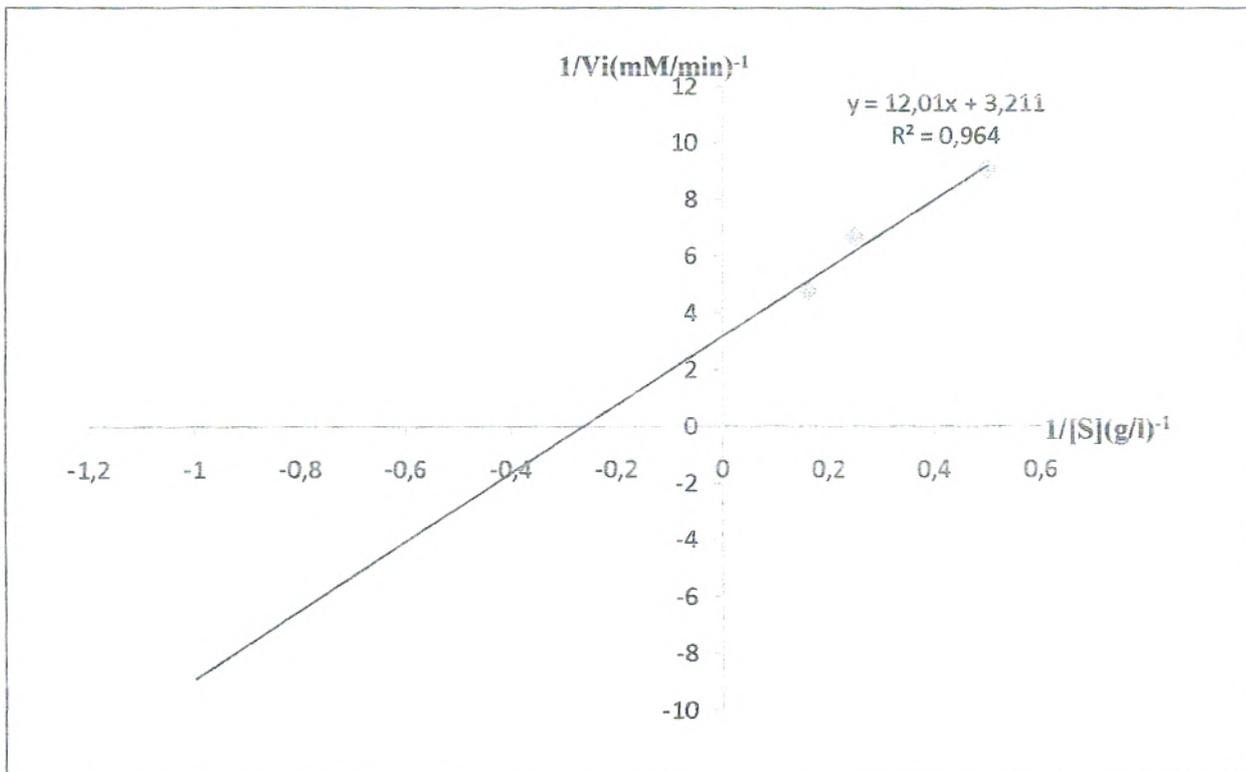


Figure 9: Représentation en double inverse de Lineweaver et Burk ($1/V_i = f(1/[S])$) de la réaction de l' α -amylase en présence des différentes concentrations de l'amidon.

À partir de la présentation précédente, nous avons déduit les résultats suivants :

$$V_{max} = 0,33 \text{ mM}/\text{min}; K_m = 3,33 \text{ g}/\text{l}$$

2.3. La cinétique enzymatique en présence de l'extrait brut de *M. vulgare*

Les concentrations de l'extrait brut hydroalcoolique de *M. vulgare* utilisées dans le milieu réactionnel sont 8 ; 10 et 12g/l avec différentes concentrations d'amidon par le même mode opératoire.

Les différentes quantités de maltose produites en fonction du temps sont présentées sur les figures suivantes (10, 11 et 12).

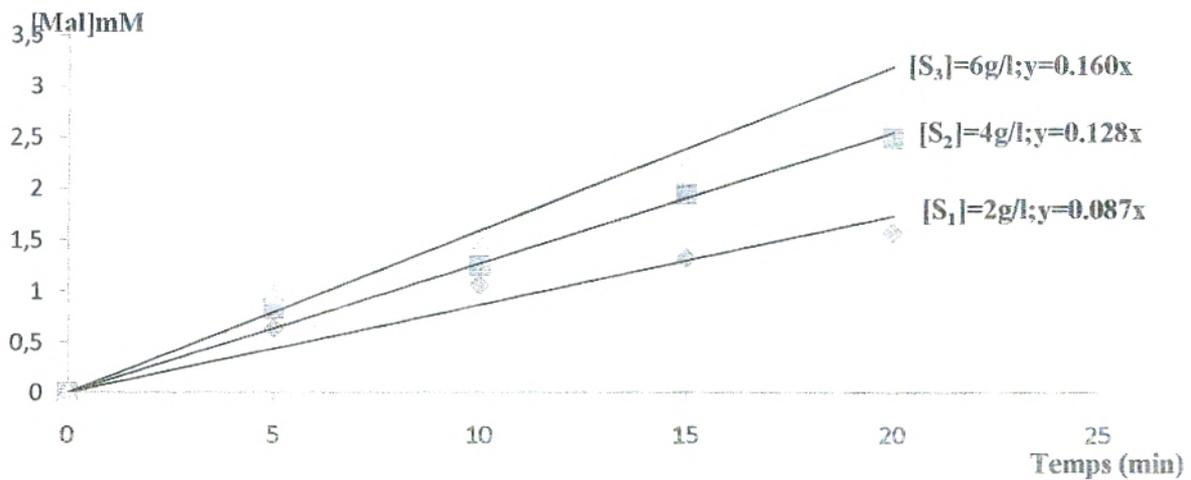


Figure 10: les quantités de maltose (mM) produites en présence de l'extrait brut du *M. vulgare* à 8g/l en fonction du temps (min)

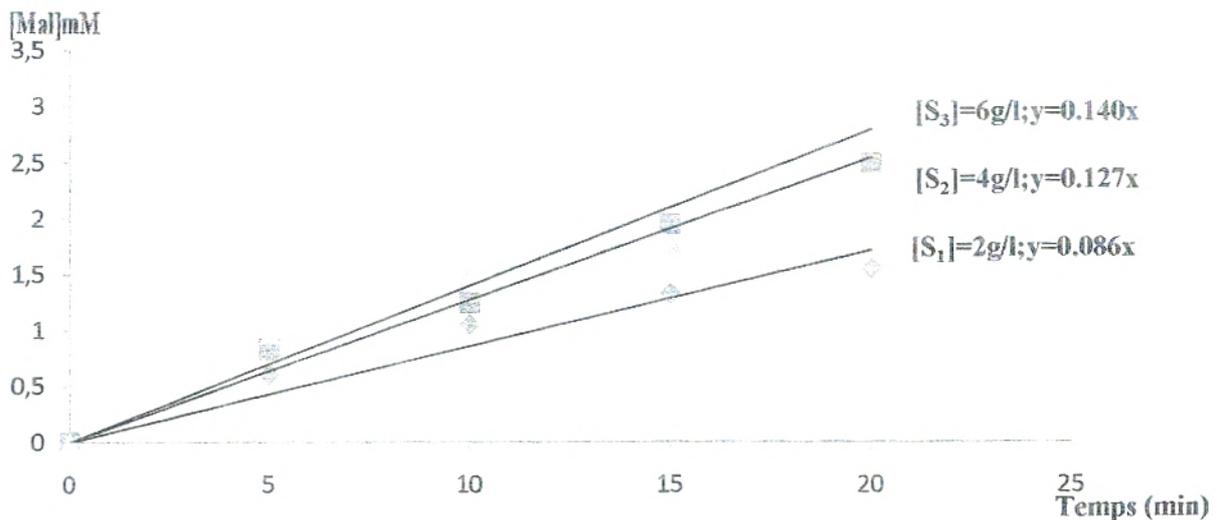


Figure 11: les quantités de maltose (mM) produites en présence de l'extrait brut du *M. vulgare* à 10g/l en fonction du temps (min).

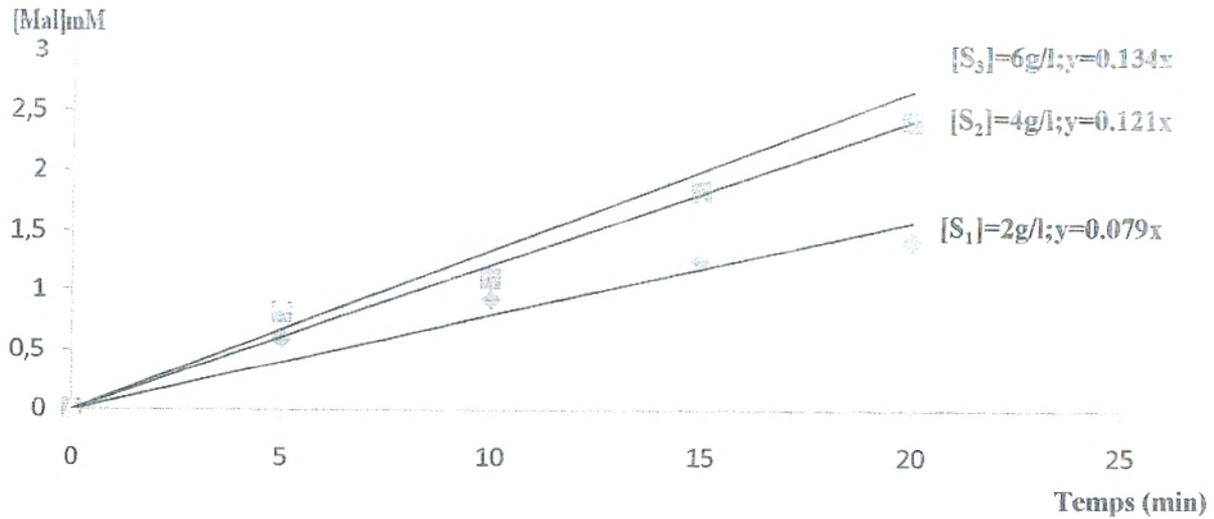


Figure 12: les quantités de maltose (mM) produites en présence de l'extrait brut du *M. vulgare* à 12g/l en fonction du temps (min).

❖ **Mesure des vitesses initiales en présence de l'extrait brut de *M. vulgare***

Les valeurs de vitesse initiales calculées à partir des courbes représentées sur les figures (10, 11 et 12.) et regroupées dans le tableau(6).

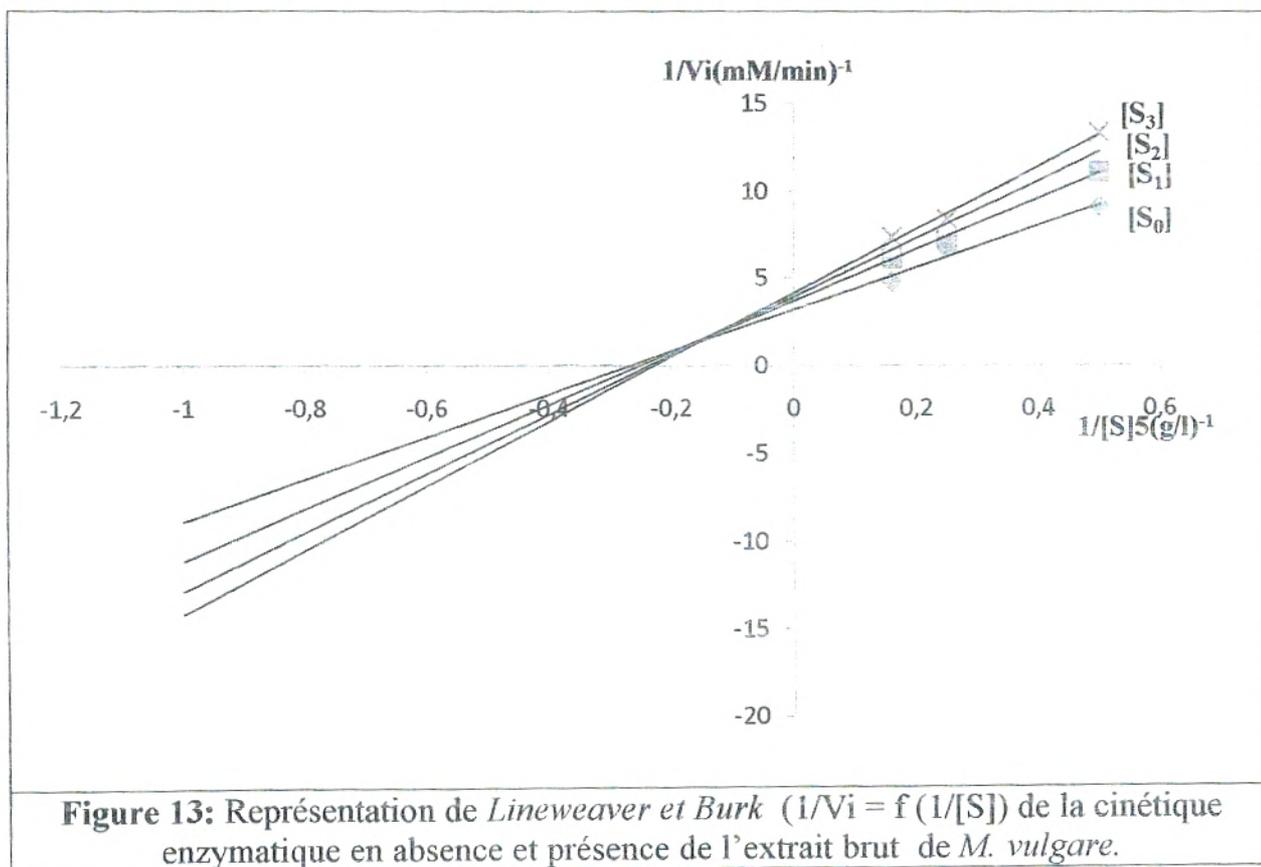
Tableau 6: les vitesses initiales en Mm/min en présence de différentes concentrations de l'extrait brut du *M. vulgare*

[Amidon] \ [Extrait]	2g/l	4g/l	6g/l
En absence de l'extrait	0,110	0,150	0,210
8g/l	0,09	0,137	0,160
10g/l	0,08	0,125	0,148
12g/l	0,074	0,119	0,136

D'après les résultats obtenus, nous avons noté une diminution des vitesses initiales en présence de différentes concentrations de l'extrait brut par rapport à celle obtenues lors de la cinétique enzymatique en absence d'inhibiteur, cela signifie qu'il y a une inhibition de l' α -amylase par l'extrait brut de *Marrubium vulgare*.

2.4. Détermination du mécanisme d'inhibition exercé par l'extrait brut de *M. vulgare*

Pour déterminer ce mécanisme nous avons tracé la courbe en double inverse de *Lineweaver et Burk* ($1/V_i = f(1/[S])$) de la cinétique enzymatique en absence et présence de l'extrait brut de *M. vulgare*.



A partir des courbes représentées sur la figure 13, nous avons déterminé les vitesses maximales (V_{max}) obtenues et les constantes de Michaelis (K_m) en présence de différentes concentrations de l'extrait brut hydroalcoolique de *M. vulgare* (Tableau 7).

Tableau 7: les vitesses maximales et les constantes de Michaelaelis obtenues en absence et en présence de l'extrait brut de *M. vulgare*

[Extrait] g/l	0	8	10	12
Vmax (mM/min)	0,33	0,25	0,22	0,20
Km (g/l)	3,33	3,70	4,00	4,34

A partir le tableau 7, nous avons observé une diminution de la vitesse maximale obtenue lors de la cinétique en absence d'inhibiteur et une augmentation de la constante de Michaelis (Km) quand la concentration de l'extrait augmente.

De ce fait, d'après les résultats présentés dans la figure 13 et le tableau 6, nous avons constaté que l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *M. vulgare* exerce un effet inhibiteur sur l'activité de l' α -amylase.

Cette inhibition est de type **non compétitif mixte**.

Discussion

Marrube Blanc (*Marrubium vulgare*) est une plante de la famille des lamiacées connue pour être utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle dans les pays du Maghreb pour traiter plusieurs maladies dont le diabète sucré [Bnouham et al., 2002 ; Eddouks et al., 2002 ; Azzi et al., 2012].

Ce n'est que récemment, les scientifiques s'intéressent de plus en plus à cette plante pour ses propriétés thérapeutiques présumées et vérifier leur effets antidiabétiques à l'aide des méthodes plus rationnelles.

Azzi et al., (2014), ont enregistré une diminution de la glycémie d'ordre de 61%, deux semaines après l'injection intrapéritonéale de 300mg/kg P.c., chez les rats wistars rendus diabétique par la Streptozotocine,

De même, Boudjelal (2012), ont montré la grande efficacité de l'infusé de *Marrubium vulgare* dans la diminution du taux de glucose sanguin.

De notre part, nous nous sommes intéressés à l'effet de *Marrubium vulgare* sur le diabète sucré à travers une étude *in vitro* sur l'activité de l' α -amylase ; tout en effectuant en premier lieu, une caractérisation qualitative (étude phytochimique) des groupes chimiques présents dans les extraits : (décoction, macération et infusion), préparés à partir de la partie aérienne (feuilles et tiges) de cette plante. En second lieu, une valorisation d'effet inhibiteur d'enzyme α -amylase par différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique, préparé par décoction.

L'étude phytochimique de différents extraits de *Marrubium vulgare* révèle la présence de différentes classes de métabolite secondaires, notamment les tanins, les alcaloïdes, les coumarines et les sucres réducteurs.

Ces résultats ont été démontré dans nombreux travaux qui ont révélé ; en plus des tanins, les alcaloïdes, les coumarines et les sucres réducteurs ; des flavonoïdes et des saponines, n'ont pas été révélé positivement. [Djahra, 2010 ; Azzi et al., 2014].

Les tests biologiques réalisés *in vitro* sur l' α -amylase d'origine d'*Aspergillus oryzae* qui hydrolyse les liaisons α -1-4 glucosidiques de l'amidon montrent que l'extrait

hydroalcoolique de *Marrubium vulgare* exerce une inhibition non compétitive mixte vis-à-vis de cette enzyme.

D'après ces résultats, on suggère que l'extrait brut de *Marrubium vulgare* agit au niveau digestif par l'inhibition de l' α -amylase, ce qui ralentit l'absorption de glucose au niveau intestinal et réduit l'hyperglycémie postprandiale. A concentration de 10mg/ml cet extrait présent un pourcentage d'inhibition de 69,40%.

Ces résultats montrent la grande efficacité de l'extrait brut du *Marrubium vulgare* dans la diminution du taux de glucose sanguin, ce qui confirme que cette plante médicinale peut être considérée comme un puissant agent dans le traitement du diabète.

Cette activité inhibitrice a été aussi étudiée par **Loizzo et al. (2008)** qui ont confirmé que l'extrait méthanolique de *Marrubium radiatum* a un effets inhibitrice sur l' α -amylase et l' α -glucosidase. Ce qui confirme son effet sur l'hyperglycémie postprandiale. Ils ont noté une IC_{50} de 61,1 et 91,2 μ g/ml vis-à-vis les deux enzymes respectivement.

De même, **Kashket et al. (1988)** ont montré que l'activité α -amylase est inhibée à 50% par les tanins du thé .

Ainsi que **Bhandri et al (2008)**, ont montré que l'extrait hydroalcoolique de *Bergenia ciliata* exerce un effet inhibiteur sur l' α -amylase et α -glucosidase avec des pourcentages d'inhibition de 93,5% et 30,2%, respectivement.

Toujours dans le but de diminuer l'hyperglycémie postprandiale, **Teixeira et al. (2007)** ont évalué le potentiel hypoglycémiant de deux plantes marines *Spataglossum schroederi* et *Caulerpa racemosa*. L'extrait acétonique de ces deux plantes exerce une activité inhibitrice sur l' α -amylase dont l' IC_{50} égale à 0,58 et 0,09mg/ml respectivement.

Conclusion

Conclusion

A la lumière des résultats obtenus, nous avons conclu que la partie aérienne (Tige, feuille) du marrube blanc (*Marrubium vulgare*) est riche en tanins, coumarines et composés réducteurs et pauvres en alcaloïdes et flavonoïdes.

De même, l'extrait hydroalcoolique de cette plante, préparé par décoction, a montré un effet inhibiteur remarquable, non compétitif, vis-à-vis l'enzyme α -amylase à différentes concentrations (10mg/ml) ; avec une IC_{50} enregistrée d'ordre de 7.24g/l.

Perspectives :

- Séparation et identification des molécules majoritaires des *M.vulgare* par des techniques chromatographiques et spectroscopique (HPLC, chromatographe sur colonne, RMN, spectro de masse.
- Etude de la toxicité de cette plante.
- Etude de l'effet des principes actifs s isolés de cette plante.

Références bibliographiques

Références bibliographiques:

ADA (American Diabetes Association). 2006. Pancreas and Islet Transplantation in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, Volume 29, Number 4.

ADA (American Diabetes Association), 2007. Standards of medical care in diabetes-2007. *Diabetes Care*; 30 (1): S4-S41.

Al kadi, A. A. Usage de quelques plantes dans la médecine populaire en libie, 1989, Vol1-2.

Allali H., Benmehdi H. , Dib M.A., Tabti B., Ghalem S., Benabadji N., 2008. Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. *Asian journal of chemistry*; 20 (04): 2701-2710.

Allain P., 2000. *Insuline .les médicaments 3^{ème} Ed.*(CDM Ed.). Novembre 2000, ISBN N ,2-9510288-1-4.

ANAES (l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé), 2000. Stratégie de prise en charge du patient diabétique de type 2 à l'exclusion de la prise en charge des complications. Service des Recommandations et Références Professionnelles. Paris; ISBN: 2-910653-73-0.

Azzi R., Djaziri R., Lahfa F., Sekkal F.Z., Benmehdi H., Belkacem N., 2012.

Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*; 6(10): 2041- 2050.

11

Azzi Rachid 2013: Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuiers (Ficus carica) et de coloquinte (Citrullus colocynthis) chez le rat Wistar.

Azzi R, Lahfa F and Djaziri R: Phytochemical, antihyperglycemic and antihyperlipidemic study of crude hydroalcoholic extract of aerial parts of *Marrubium vulgare* L. in normal and streptozotocin induced-diabetic wistar rats. *Int J Pharm Sci Res* 2014; 5(5): 2006-13.

Bailey C.J., Day C., 1989. Traditional plant medicines as treatment for diabetes. *Diabetes Care*; 12:553-564.

Banner ,D.W., Bloomer , A.C ., Petsko, G.A.,Phillips D.C., Pogson, C.L.,Wilson , I.A., Corran, p.H., Furth , A.J., Milman ,J.D., Offord ,R.E., Priddle,J.D.,and Waley, S. G.1975.structure of chicken muscle triose phosphates isomérase determined

crystallographically at 2.5Å° resolution : Using amino acide sequence data .Nature 255,609-614.

Barceló A., 1996. Série de monographies sur les maladies liées au vieillissement: VIII. Diabète sucré non-insuline-dépendant. Maladies chroniques au Canada ; 17(1) : 1-21.

Bellakhdar, J., 1997 Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires La pharmacopée marocaine traditionnelle, ibis Press,.

Bernfeld ,P ;1955.amylase , α and β , in Methods in Enzymology.(colowick S. and Kaplan N.O.eds),Academic Press, New York.1:149-158.

Berry D.R. et Paterson A. 1990 .Enzymes in food industry .p. 306-351.in suckling C.J. Enzyms chemistry des alpha-glucosidases ; Rew Méd interne; 20[3]:379-83.

Blickle J.F Andres E ., Brogard J.M.,1999. Actualisés dans le traitement du diabète de types 2. L'inhibition des alpha –glucosidases . Rev Med interne ; 20 suppl 3 :379-83.

Bnouham M., Mekhfi H., Legssyer A., Ziyyat A., 2002. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. Int. J. Diabetes Metab.; 10: 33-50.

Boizot N., and Charpentier .J.P. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra. Pp 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

Boudjelal A., Henchiri C., Siracusa L., Sari M. and Ruberto G. 2012. Compositional analysis and in vivo antidiabetic Activity of Wild Algerian Marrubium vulgare L. infusion. Fitoterapia 83: 286–292.

Bruneton, J. 1999. Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.

Burhan A., Unaldi N ., C oral G., Colak.O., Aygan A., Gulnaz O.2003.Enzymatic properties of a novel thermophilic , alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic B acillus sp.Isolate ANT-6.process B iochemistry . (38): 1397-1403.

Buyschaert M., Hermans M.P., 1998. Critères révisés et nouvelle classification des diabètes sucrés. Louvin Med.; 117: 1-6.

Calne R. 2005. Cell transplantation for diabetes. Phil. Trans. R. Soc. B (2005) 360,1769–1774.

Capet F., Debaille R., Tafforeau J., Van-Oyen H., 1999. Situation Actuelle et Eléments pour le développement d'une Politique de Santé : diabète épidémiologie. CROSP; 19 (1-12): 27-28.

Chiba S . 1988. Amyloglycosidase . In Handbook of Amylase and related enzymes (The Amylase Research Society of Japan ,éd .). Pergamum Press, Oxford, U.K.pp 104-116.

Çitoğlu G.S. and Aksit F. 2002. Occurrence of marrubiin and ladanein in *Marrubium trachyticum* Boiss. from Turkey. *Biochem Syst Ecol*, 30:885–886.

Dellile L. 2007. Les plantes médicinales d'Algérie.

DeSouza M M, DeJesus R A P, Cechinel-Filho V and Schlemper V: Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine* 1998; 5: 103–107.

Domus M., 1998.Synthèse médicale ,668 :6-22.

Drouin P., Blicke J.F., Charbonnel B., Eschwege E., Guillausseau P.J., Daninos J.M., Balarac N., Sauvanet J.P., 1999. Diagnostic et classification du diabète sucré. Les nouveaux critères. *Diabète et Métabolisme*. Paris ; 25(1) : 72-83.

Eddouks M., Maghrani M., Lemhadri A., Ouahidi M.L., Jouad H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J. Ethnopharmacol.*; 82: 97-103.

Eddouks M., Ouahidi M.L., Farid O., Moufid A., Khalidi A., Lemhadri A., 2007. L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie* ; 5: 194-203.

Edelman S.V.,1998. Type 2 diabetes mellitus .*Adv.Inter.Med.*, 43 :449-500.

Eisenberg D.M., Kessler R.C., Foster C.,et al .,1993.Unconventional medicine in the United States .*N.Engl.J.Med.*, 328:246-52.

El-Bardai S, Morel N, Wibo M, Fabre N, Llabres G and Lyoussi B: The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Med* 2003; 69 (1): 75–77.

- El-Bardai S, Lyoussi B, Wibo M and Morel N:** Comparative Study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* 2004; 26(6): 465-474.
- Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D. 2007.** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.
- Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z. 1986.** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé.*, 64 (2) : 159-164.
- Ferlié ,C ;2011.** Des exemples de plantes dans le diabète de type 2 :activité et prévention thèse pour le diplôme de docteur d'état en pharmacie . Université de Lille 2 .Faculté des Sciences Pharmaceutique et Biologique de Lille.
- Fogarty W.M.,Kelly C.T.1980.** Amylase , amyloglucosidase and related glucanases . In Rose (A.H.) Ed *Economic microbiology , microbial enzymes and bioconversion* .London : Academic Press . 5,p . 115-170.268.
- Fogel M.R.,Gray G.M. 1973.**Starch hydrolysis in man : an intera – luminal process not requiring membrane digestion . *J Appl Physiol* ,35,263-267.
- Gaborit B and Andreelli F. 2008.** Anti-hyperglycemic effects of thiazolidinediones. *Nutrition Clinique et Métabolisme* Volume 22, issue 2, p.84-87.
- Gerrard ,J.A. ,Prince,M.J.and Abell, A.D.,2000.** Kinetic Characterisation of EneDiol-Based Inhibitors of α -Amylase ,*Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 1575-6.
- Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M. 2001.** Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris. pp275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- Goetz .p.2007.**Postprandial du diabète . Springer ;5 :212-217.
- Grover J.K., Yadav S., Vats V., 2002.** Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J. of Ethnopharmacol.*; 81:81-100.

Halimi S., Rostoker G., Altman J.J., Attali C. et al., 1999. Traitement médicamenteux du diabète de type 2. Agence française de sécurité des produits de santé. Recommandation de bonne pratique : 13-19.

Hamza N., 2011. Effets préventif et curatif de trois plantes médicinales utilisées dans la Wilaya de Constantine pour le traitement du diabète de type 2 expérimental induit par le régime « high fat » chez la souris C57BL/6J. Thèse Doctorat en science

alimentaire option : Nutrition. Univ. Mentouri Constantine, Institut de Nutrition de l'alimentation et des Technologies agroalimentaires : 32-61.

Igarashi K., Hatada Y., Hagihara H., Takaiwa M., Eumura T., Ara K., Ozaki K., Kawai M., Kobayashi T., Ito S., 1998. Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9):3382-3389.

Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A. 2001. Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.

Ivorra M.D., Paya M., Villar A., 1989. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. *J Ethnopharmacol.*; 27: 243-75.

Jarald E., Joshi S.B., Jain D.C., 2008. Diabetes and herbal medicine. *Iranian Journal of Pharmacology and therapeutics*; 7: 97-106.

Kashikar V.S., Kotkar T., 2011. Indigenous remedies for diabetes mellitus. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 3 (3): 22-29.

Khashket et al., 1988: inhibition of salivary amylase by water soluble extract of tea Arch oral boil., 33-845-846.

Khanbabae K and Ree T.R. 2001. Tannins: Classification and Definition. *Journal of Royal Society of Chemistry*. 18: 641-649. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

Kumar ,S ; Narwal, S ; Kumar , V ; Prakash, O ; 2011. α -glucosidase inhibitors from plants : A natural approach to treat diabetes . *Pharmacognosy Reviews*. 5(9):19 29.

Larger E., 1997. Le Mécanisme d'action des antidiabétiques oraux . médecine thérapeutique , paris ; Hors série :97-102.

Loizzo M.R., Saab A.M., Tundis R., Menichini F., Bonesi M., Piccolo A., De Cindio B., Houghton P., 2008 : *in vitro* inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against an angiotensin converting enzyme (ACE) and digestion enzymes related to diabetes *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1):109-116.

Lugasi A., Hovari J., Sagi K., and Biro L. 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J. Acta biologica. szegediensis.* 47 (1-4):119-125. (Cited in Mohammedi Z, 2005).

Madjdoub, H ; 2006. Etude Phytochimique et Activité Biologique de *Zygophyllum gestini* coss. Mémoire de maîtrise en biochimie. Université de Tlemcen .

Marles R.J., Farnsworth N.R., 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: 13-189.

Masoodi M. H., Ahmed B., Zargar I. M., Khan S. A., Khan S. and Singh P. 2008. Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *African J Biotechnol*, 7: 86-87.

McDougall G.J. Stewart D 2005. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*, 23 :189-195.

Mohammedi zohra 2013: Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie.

Moore H., Summerbell C., Hooper L., Cruickshank K., Vyas A., Johnstone P., Ashton V., Kopelman P., 2004. Dietary advice for treatment of type 2 diabetes mellitus in adults. *The Cochrane database of systematic Reviews Issue 2, Art.N°. CD004097.pub.2.*

Nawwar M.A.M., El-Mousallamy A.M.D., Barakat H.H., Buddrus J. and Linscheid M. 1989. Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, 28: 3201-3206.

Naylor C.D., Sermer M., Chen E., Farine D., 1997. Selective screening for gestational diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*; 337 (22): 1591-1596.

Novak, I. ; Buzas, G. ; Minker, E. ; Kolfai, M. et Szendrei, K. Planta med . 1966, 14, p: 57.

Odhav,B ; Kandasamy,T ;Khumalo, N ;Baijnath,H.2010. screening of african traditional vegetables for their alpha – amylase inhibitory effet .Journal of Medicinal plants Research. 4(14):1502-1507.

OMS (Organisation mondiale de la santé), 2011. Diabète. Aide-mémoire ; N°312.

OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 2002a. Diabète sucré. Aide mémoire ; N°138

OMS (Organisation mondiale de la santé), 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO consultation. Geneva, WHO/NCD/NCS/99.2: 1-49.

Ortiz-Andrade R.R.V., Rodriguez-Lopez M.L., Garduno-Ramirez P., Castillo- Espana S.,Estrada-Soto,2005.Anti-diabetic affetions on alloxinized and normoglycemic rats and some pharmacological evaluations of Tournefortia hartwegiana .Jounal of Ethnopharmacology,101:37-42.

Oubré A.Y., Carlson T.J., King S.R., Reaven G.M., 1997. From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of news drugs for the treatment of NIDDM. Diabetologia; 40: 614-617.

Papoutis Z., Kassi E., Mitakou S., Aligiannis N., Tsiapara A. and Chrousos G.P. 2006. Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. J. Steroid Biochem Mol Biol, 98: 63–71.

Paris M., Hurabielle M., 1981. Abrégé de Matière médicale (Pharmacognosie). Tome1. Ed. Masson, Paris: 256-266.

PDB (protein data base). 2006. Alpha –amylases
<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1KGU>

Quezel P. and Santa S. 1962. Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, Tome I. 565 p.

Raccah D., 2004. Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. EMC-Endocrinologie; 1 : 29-42.

Rahman A.U., Zaman K., 1989. Medicinal plants with hypoglycemic activity. J. of Ethnopharmacol.; 26: 1-55.

Roman-Ramos R., Florez-Saenz J.L., Alarcon-Aguilar F.J., 1995. Antihyper glycemic effect of some edible plants. J. of Ethnopharmacol.; 48: 25-32.

Sahpaz S, Garbacki N, Tits M and Bailleui F: Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. J Ethnopharmacol 2002; 79(3):389–392.

Sales , P.M;Souza ,P.M;Simioni,L.A; Magalhaes ,P.D.O ;Damaris,S;2012.

α -amylase Inhibitors : A review of raw material and isolated compounds from plant source .J pharm pharmaceut Sci.15(1)142-183.

Scheen A.J, Letiexhe M.R, Geronooz I, Paquot , Jandrain N, B.2002. L'Hyperglycémie Poste-Principale . Approches thérapeutiques médicamenteuses .Re Med Liege ;57:4:196-201.

Seyoum A., Asres K., and El-Fiky F.K. 2006. Structure– radical scavenging activity relationships of flavonoids. Phytochemistry. 67: 2058–2070.

Singh U., Singh S., Kochhar A., 2012. Therapeutic potential of antidiabetic nutraceuticals. Phytopharmacology; 2(1) 144-169.

Soumyanath A., 2006. Traditional Herbal Medicines for Modern Times: Antidiabetic plants. CRC Press (Taylor Francis Group); 6: 19-82.

Stéphane Lecleire , 2008. Digestion et Absorption des Nutriments , Cah .Nutr43,1.

Street NC and Korbitt GS. 2002. Stem Cells as a Source of Islets for Transplantation in Type 1 Diabetes: Scientific and Ethical Considerations. Canadian Journal of Diabetes 27(3):262-270.

Tahraoui A., El-Hilally J., Israili Z.H., Lyoussi B., 2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in South-eastern Morocco. J. Ethnopharmacol.; 110: 105-117.

Talamond P ., Desseaux V .,Moreau Y ., Santimone M .Marseillemoy2002.Isolation ,characterization and inhibition by acarabose of the alpha amylase from lactobacillus fermentation : comparison with Lb Manihotvon Lb palantarum amylase .cmp B iochem. Physiology .Biochem Mol biology.

Teixeira V.L., Rocha F.D., Houghton P.J., Kaplan M.A. Pereira R.C., 2007: α -amylase

Inhibitors from Brazilian seaweeds and their hypoglycaemic potential .*Fitoterapica*,78:35-36

Tundis R , Loizzo MR , Menichini F. 2010.Natural products as alpha –amylase and alpha –glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update .*Mini Rev Med Chem* ,10:315-331.

Virally M., Tielmans A., Laloi-Michelin M., Coupaye M., Meas T., Guillausseau P.J., 2007. Traitement médicamenteux du diabète de type 2 (première partie). *Diabétologie ; Presse Med.*; 36 (2) : 69-78.

Weel K C G, Venskutonis P R, Pukalskas A, Gruzdiene D and Linssen J P H: Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare*) grown in Lithuania. *Fett/Lipid* 1999; 101(10): 395–400.

Wens J.,Sunaert P.,Nobels F.,Feyen L., Crombruggen P.V., Bastiaens H., Royen P.V .,2007. Diabete sucré de type 2. Recommandation de bonne pratique . Société Scientifique de Médecine Générale (SSMG),02 :3-72.

الملخص

يركز هذا العمل على البحث في المختبر عن التأثير المثبط للأنزيم الالفا اميلاز بواسطة تراكيز مختلفة للمستخلص الكحولي للجزء العلوي لنبته النعناع الابيض (مريوة) و هي نبته تستعمل لمعالجة داء السكري .

يبدأ العمل في تحضير مستخلصات انتقائية من الجزء العلوي للنعناع الابيض .

اظهرت التحاليل الكيميائية النباتية وجود الالكالويد, الكومارين, السكريات الرجعية و الدباغ في مستخلصات النبته .

الاختبارات التي اجريت في المختبر على نشاط الالفا اميلاز اظهرت ان للنبته تأثير يعتمد على الجرعة و الية التثبيط الخلطي اللاتنافسي .

بناء على هذه النتائج نستنتج ان مستخلص النبته لديه فعالية في تثبيط نشاط الانزيم الالفا اميلاز .

الكلمات المفتاحية : النعناع الابيض , داء السكري , النباتات الطبية , الالفا اميلاز, النشاط الانزيمي .

Résumé

Ce travail porte sur la recherche, *in vitro*, de l'effet inhibiteur d'enzyme α -amylase par différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique, préparé par décoction, de la partie aérienne du Marrube blanc (*Marrubium vulgare*), plante utilisée dans le traitement de diabète sucré .

Le travail est initié par une extraction sélective à partir de la partie aérienne du *Marrubium vulgare* .

L'analyse phytochimique a révélé la présence d'alcaloïdes, de coumarines, de sucres réducteurs et de tanins dans les extraits préparés de la plante.

Les testes réalisés *in vitro* sur l'activité de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* montrent que nos extraits exercent un effet inhibiteur variable dose-dépendant, et le mécanisme d'inhibition est non compétitive mixte .

En fonction de ces résultats on suggère que nos extraits peuvent exercer un effet inhibiteur *in vitro* sur l'absorption intestinale des glucides en inhibant l' α -amylase.

Mots clé : *Marrubium vulgare*, Le diabète sucré, Les plantes médicinales, l' α -amylase, inhibition, activité d' α -amylase .