

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de recherche

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

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du Diplôme d'Etude Supérieur en Biologie, option

«Biochimie»

**THEME**

Contribution à l'étude *in vitro* de l'effet des extraits de feuilles de *Retama raetam* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase.

Présenté par : **M<sup>r</sup> HADJ MOUSSA ALI**

**Soutenance le 10/07/2012 devant le jury :**

M <sup>r</sup> DJAZIRI R.	Maitre de conférence	Président	Université de Tlemcen
M <sup>elle</sup> BENARIBA N.	Maitre assistante	Promoteur	Université de Tlemcen
M <sup>me</sup> BENMANSOUR M.	Maitre assistante	Examinatrice	Université de Tlemcen

**Année Universitaire 2011-2012**

# Table de matière

Introduction.....	1
-------------------	---

## Partie I: Rappels Bibliographiques

### Chapitre 1: Généralité sur le diabète sucré

1- Définition du diabète sucré.....	2
2- Epidémiologie.....	2
3- Classification du diabète.....	2
4- Les plus fréquent type du diabète.....	3
4-1- Le Diabète Insulino-Dépendant (DID).....	3
4-2- Diabète Non Insulino-Dépendant (DNID).....	3
5- Diagnostic.....	3
6- Complication du diabète sucré.....	4
7- Traitement de diabète sucré.....	4

### Chapitre 2: *Retama raetam*

1- Utilisation de plantes médicinales.....	7
2-Distribution géographique de <i>Retama raetam</i> .....	8
3- Systématique de <i>Retama raetam</i> .....	9
4- Description botanique.....	9
5- Importances de <i>Retama raetam</i> .....	10
6- Effet antidiabétique.....	11
7- Composition chimique.....	11

### Chapitre 3: Alpha amylase

1-La digestion de glucides.....	13
2-Dégradation de l'amidon.....	14
3-Structure d'alpha amylase.....	15
4-Mécanisme d'action.....	18
5-L'inhibition d'alpha amylase.....	18

## Partie II: Matériel et Methode

I-Préparation de l'extrait.....	19
I-1- Matériel végétal.....	19
I-2- Extractions.....	20
I 2-1 préparations de l'extraits aqueux par macération (EA1).....	20
I 2-2 préparations de l'extraits aqueux sous reflux (EA2).....	20
I 2-3 préparations de l'extrait eau methanol (EM).....	21

I 2-4 préparations de l'extraits n-butanol (n-B1).....	21
I-2-5 Préparation de l'extrait eau acétone (EAc) .....	21
I 2-6 préparations de l'extraits n-butanol (n-B2).....	21
I-3-Calcul de rendement.....	23
II-Analyses phytochimiques.....	23
II-1- Tests phytochimiques.....	23
II-2 - Chromatographie sur couche mince.....	25
II-3-Dosage de polyphénols.....	26
II-4-Dosage de flavonoïdes totaux.....	27
III - Tests <i>in vitro</i> de l'effet des extraits préparés sur l'activité d' $\alpha$ -amylase.....	28
III - 1- Matériels.....	28
III - 2- Méthodes.....	29

### **Partie III: Résultat et Discussion**

1-Rendement de l'extraction .....	30
2-Tests phytochimiques.....	31
3-Analyse chromatographique sur couche mince (CCM).....	32
4-Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux.....	38
5-Effet des extraits de <i>Retama raetam</i> sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase <i>in vitro</i> .....	40
Discussion.....	43
Conclusion.....	47
Référence bibliographique.....	48



# *DEDICACE*

*A*

*Mes parents,*

*Pour vos mains qui ont tant travaillées,*

*Pour votre cours qui m'a ton donné,*

*Pour vous qui m'avez tant aimé. Que Dieu les protège.*

*Mes frères: Rezki, Hamza, Khaled et Najat et je n'oublie pas son mari*

*Yacine et leur fille mamma Lalla*

*Les membres de ma famille paternelle et maternelle.*

*Ma fiancée et son famille Bamossa;*

*Mes amis d'enfance, d'étude en particulier Sofiane et Anouar, de la cité*

*universitaire, de laboratoire de recherche.*

*Aux étudiants de la promotion Biochimie 2011/2012 en particulier Zohir*

*et Amine.*

*Je dédie ce travail*

*Ali F*

## REMERCEMENT

الحمد لله الذي هدانا لهذا وما كنا لنهتدي لولا أن هدانا الله

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

*J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à mon encadreur M<sup>elle</sup> Benariba N. Chargée de cours au département de Biologie, Université Abou Beker Belkaid-Tlemcen-. Pour l'intéressant sujet qu'il ma avait proposé et qui n'a cessé de m'orienter et m'appuyer a chaque étape; c'est par sa disponibilité, ses conseils précieux et son aide que ce travail s'est concrétisé.*

*J'exprime également mes sincère remerciement à M<sup>me</sup> Boucherit Z. maitre de conférence et Directrice du laboratoire de recherche Université Abou Beker Belkaid-Tlemcen-.qui m'a accorde l'accès à ce laboratoire <<Antibiotique, Antifongique, physico-chimique, synthèse et activité biologique>> où j'ai réalisé ce travaille.*

*J'exprime également ma profonde reconnaissance à M<sup>r</sup> DJAZIRI R .Maitre de conférences au département de Biologie, Université Abou Beker Belkaid-Tlemcen-.Pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury.*

*Mes vifs remerciements vont M<sup>me</sup> BENMANSOUR M. Chargée de cours au département de Biologie, Université Abou Beker Belkaid-Tlemcen-. Pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Que M<sup>elle</sup> BELKACEM N. doctorant en Biochimie, trouve ici tout ma gratitude pour l'aide qu'elle m'a prodigué et pour ses conseils au cours de la réalisation ce travail.*

*J'aimerais aussi mes sincère remerciement à Mr Ziani M. Chargé de cours au département de Biologie université de Laghouat, pour son aide est ses conseil.*

*J'adressé aussi mes sincère remerciement M<sup>r</sup> NOHMAFNON A; M<sup>r</sup> TARTORA M. des ingénieurs d'état en agronomie qu'ils mont aidé beaucoup dans le coté végétale.*

*J'aimerais remercier tous mes collègues du Laboratoire Zinedine, Noradin, Mehamed, Sofian, Horia, Asma, Asmahan, Rabih, Chiama, pour leur aide et leur soutient.*

*Au risque de me répéter, j'exprime mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de cette thèse.*

## Liste des figures

---

<b>Figure 01:</b> <i>Retama raetam</i> (Forssk.) Webb et Berth.....	10
<b>Figure 02:</b> structure de deux nouveaux flavonoïdes de <i>Retama raetam</i> .....	12
<b>Figure 03:</b> Description schématique de la digestion des hydrate de carbone par les différents enzymes du tube digestif.....	15
<b>Figure 04:</b> Diagramme en ruban de structure d'alpha amylase humain.....	17
<b>Figure 05:</b> structure et le site catalytique de l'α- amylase.....	17
<b>Figure 06:</b> Feuilles de <i>Retama raetam</i> séchées à température ambiant au laboratoire.....	19
<b>Figure 07:</b> Extraction sous reflux de feuille de <i>Retama raetam</i> .....	20
<b>Figure 08:</b> Evaporation à sec par le retavapor .....	22
<b>Figure 09:</b> Montage de l'extraction liquide/liquide.....	22
<b>Figure 10:</b> Montage de la distillation.....	23
<b>Figure 11:</b> les deux photos représentèrent la révélation de la plaque de CCM par la lampe UV au deux onde 254 nm et 365nm.....	33
<b>Figure 12:</b> Courbe étalon de l'acide gallique .....	39
<b>Figure 13 :</b> Courbe étalon de la catéchine .....	39

## Liste des Abréviations

---

EA1 :	Extrait aqueux sous reflux
EA2 :	Extrait aqueux en macération
EAc :	Extrait eau acétone brut
EM :	Extrait eau méthanol brut
n-B1:	La phase n-butanol de l'extrait eau méthanol brut
n-B2:	La phase n-butanol de l'extrait eau acétone brut
DO:	Densités optique
DID:	Diabète insulino-dépendant
DNID:	Diabète non insulino-dépendant
OMS:	Organisation mondiale de la santé
CCM:	Chromatographie sur couche mince
ATP:	Adénosine triphosphate
GPP:	Glycémie postprandiale

## Liste des Tableaux

---

<b>Tableau 01:</b> Taux de la glycémie au cours de test de l'hyperglycémie provoquée par voie orale .....	4
<b>Tableau 02 :</b> Liste de quelque plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète.....	8
<b>Tableau 03:</b> Les enzymes de la degetion des sucres.....	13
<b>Tableau 04:</b> Caractéristiques des extraits de feuille de <i>Retama raetam</i> .....	30
<b>Tableau 05 :</b> Résultats des tests pytochimiques réalisés sur les extraits de feuilles de <i>Retama raetam</i> . .....	31
<b>Tableau 06: Tableau 6 :</b> les $R_f$ de chromatographie couche mince des extraits de <i>Retama raetam</i> .....	34
<b>Tableau 07:</b> Différents composants identifier par CCM dan les extraits de <i>Retama raetam</i> .....	36
<b>Tableau 08 :</b> le taux des polyphénols totaux et flavonoïdes totaux dans les extraits de <i>Retama raetam</i> .....	39
<b>Tableau 09:</b> Le pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase des extrait de <i>Retama raetam</i> et leur DO.....	41
<b>Tableau 10:</b> Le pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par les extraits de <i>Retama raetam</i> .....	41

## Résumé

Le but de cette étude est l'évaluation de l'effet des extraits des feuilles de *Retama raetam* *in vitro* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase. Différents extraits aqueux et organiques sont incubés en présence de l' $\alpha$ -amylase et le substrat (amidon) à 25 C° pendant 5 min.

Les résultats phytochimiques obtenus ont révélé la richesse de *Retama raetam* en alcaloïdes, flavonoïdes et en polyphénols. Ceci est confirmé par le dosage des polyphénols qui a démontré que les extraits n-butanol, eau méthanol sont riche en ces composés de 272.46  $\mu\text{g}$  équivalent acide gallique par mg d'extrait et 125.05  $\mu\text{g}$  équivalent catéchine par mg de l'extrait respectivement.

De plus, les extraits préparés à partir des feuille de *Retama raetam* ont présenté un effet inhibiteur sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase dose-dépendent ; dont l'extrait aqueux sous reflux a inhibé 72 % de l'activité, suivie par l'extrait eau méthanol de 66.12 % à la même concentration.

Suivant les résultats obtenus, l'effet inhibiteur des extraits de *Retama raetam* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase est fortement lié à sa richesse en flavonoïdes et en polyphénols. Ce résultat constitue une piste pour une éventuelle étude *in vivo*.

**Mots clés :** *Retama raetam*, polyphénols,  $\alpha$ -amylase, *in vitro*.

# Introduction générale

---

Le diabète sucré est l'une des principales causes de décès dans la plupart des pays développés, en développement ou récemment industrialisés (**Antonio et al., 2007**). Le diabète, et notamment le diabète de type 2 (DT2), touche 5,9 % de la population adulte mondiale. En Algérie plus de trois millions de population sont diabétiques. Selon les dernières statistiques de la direction de la prévention au ministère de la santé algérienne, plus de 84 % des personnes atteintes de diabète de type 2 affichaient des taux de glycémie très élevés après les repas (**Bonora et al., 2006; Msante, 2011**). Cette glycémie postprandiale peut contribuer indirectement aux complications du diabète, en particulier les maladies cardiovasculaires responsables de la majorité des décès liés au diabète (**Niskanen et al., 1998; Ceriello, 2005**).

Le traitement actuel du diabète sucré vise à soigner et non à guérir la maladie ce qui représente un échec des traitements pharmaceutiques conventionnels, surtout dans le cas des maladies chroniques. De ce fait, et malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne, les plantes médicinales trouvent encore leurs indications thérapeutiques dans le traitement d'une multitude d'affections et de maladies dans les différentes sociétés et cultures, y compris dans les pays développés (**De Smet et al., 2002; Eisenberg, 1993**). Dans 81% des cas, les indications traditionnelles de plantes antidiabétiques ont été expérimentalement confirmées (**Marles et al., 1995**). L'exemple classique est celui de *Galéga officinalis*, une plante largement utilisée dans le traitement du diabète en Europe (**Oubre, 1997**).

Par ailleurs le traitement traditionnelle de plusieurs maladies, dont le diabète sucré, les maladies cardiovasculaires et autres pathologies est une coutume connu en Algérie qui possède un riche patrimoine d'agro-ressources médicinales et alimentaires. Ce qui fait de la flore algérienne une piste très intéressante pour la mise en valeur de l'activité thérapeutique de ces plantes. Dans ce cadre, l'objectif de notre étude est porté sur *Retama raetam* plante endémique algérienne largement utilisée en médecine traditionnelle, afin de tester l'effet de cette plante sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase.

Le plan de cette étude est résumé en deux parties, une étude phytochimique des extraits préparés afin de vérifier la présence ou l'absence de certaines familles chimiques avec un dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux. Et une étude qui s'intéresse à tester *in vitro* l'effet des extraits préparés sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase.

# Partie I : Rappels Bibliographiques

---

## 1- Définition du diabète sucré

Le terme générique du mot diabète désigne un groupe d'affections caractérisé par une polyurie, polydipsie et parfois une polyphagie, et qui accompagnent une maladie chronique liée à un trouble de la glucorégulation (hyperglycémie), consécutive d'une sécrétion insuffisante d'insuline (diabète insulino-dépendant, ou type I) ou d'une carence ou mauvaise utilisation de l'insuline (diabète non insulino-dépendant, ou type II). (**Jacques et al., 2007**).

## 2- Epidémiologie

La répartition des causes du décès selon une enquête de l'Institut National de Santé Publique (INSP) Algérien en 2005 et selon la classification GBD (Global Burden of Disease), montre que, le diabète occupe la 4<sup>ème</sup> place parmi les dix premières causes de décès dans le monde. Les systèmes de santé dépensent 465 milliards de dollars annuellement pour le traitement de cette épidémie. Il frappe plus durement les pays en voie de développement (majorité entre 45-65 ans) dont 50 à 80 % du budget de santé est consacré à cette maladie (**IDF, 2006; Singh 2008**).

Le nombre de diabétique dans le monde est estimé de 300 millions en 2025, soit une prévalence de 6,3 % de la population mondiale; a travers l'Afrique, le Moyen-Orient, et l'Amérique Centrale, la prédominance du diabète est estimée d'environ 80 % au cours des 15 années à venir (**Nauck et al., 2009**).

En Algérie, la prévalence du diabète a été estimée à 8.9 % en 2004 chez la population âgée de 25 à 64 ans et à 12.3 % en 2005 chez la population âgée de 35 ans et plus; Soit une estimation de près de 1.3 millions de diabétiques ce nombre peut atteindre près de 4.2 million de diabétique en 2025 (**Mesbah, 2010**).

## 3- Classification du diabète

Le comité international d'experts présente une nouvelle classification étiologique des diabètes sucrés, cette classification est actualisée en fonction des données scientifiques récentes. On distingue deux types majoritaires: le diabète de type 1, le diabète de type 2 et des types minoritaire, diabète gestationnel et autres types spécifiques (anomalie génétique de la fonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques (MODY), anomalie génétique de l'action de l'insuline, maladie du pancréas exocrine, diabète au cours des endocrinopathies, diabètes induits par des médicaments) (**ECDCDM, 1997**).

## 4- Les plus fréquent type du diabète

### 4-1- Le Diabète Insulino-Dépendant (DID) :

Diabète de type 1 ou diabète de l'enfant, touche environ 10 % de la population diabétique, liée à une autodestruction des cellules pancréatique  $\beta$ . Certains facteurs liés à la prédisposition génétique et l'environnement contribuent au développement du diabète de type 1 (**Fabrice et al., 2005 ; OMS 2009**).

### 4-2- Diabète Non Insulino-Dépendant (DNID)

Ce type de diabète représente 90 % de l'ensemble des cas mondiaux et il débute généralement après l'âge de 40 ans (**Buyschaert et al., 1999 ; Raccah, 2004**). Il résulte de l'incapacité de l'organisme à sécréter ou à réagir correctement à l'action de l'insuline, insulino-résistance ou insulino-pénie (**Calop et al., 2008 ; Raccah, 2004**). Sa prévalence augmente avec l'âge, le mode de vie occidental, la réduction de l'activité physique, les apports élevés en calories et l'obésité. (**Dowse et al., 1996; Ramachandran et al., 1997**).

Il existe une forte influence familiale dans la genèse de ce type de diabète, l'influence des facteurs génétiques est bien établie (**Beck-Nielsen et al., 1994**).

## 5- Diagnostic

Les spécificités physiopathologiques expliquent la variabilité des signes cliniques, propres à chacune de ces complications. Il existe néanmoins des symptômes communs, dont les plus évocateurs, à leur phase initiale, sont la polyurie et la polydipsie qui témoignent de l'installation de l'hyperglycémie et de ses conséquences sur la volémie corporelle (**Radermacher et al., 2005**).

Au niveau du contrôle des constantes biologiques, on remarque une hyperglycémie à jeûne et une glucosurie. L'examen chez les patients est basé sur la mesure de la glycémie à jeûne et le test de l'hyperglycémie provoquée par voie orale. Chez les quelles leur glycémie à jeûne élevée, augmente encore une heure après l'administration orale de 75 g de glucose dissous dans 250 ml d'eau. Cette hyperglycémie ne retrouve pas sa valeur basale après 3 heures de suivi (Tableau 1) (**Goetz, 2007**).

**Tableau 01:** Taux de la glycémie au cours de test du l'hyperglycémie provoquée par voie orale (Goetz, 2007).

Pathologies	Glycémie à jeune	Glycémie après 2 heures	Taux intermédiaire (entre repas)
Normale	< 6,3 mmol/l	< 7,7 mmol/l	< 11 mmol/l
Diabète Gestationnel	> 5,8 mmol/l	> 9,2 mmol/l	>10,6 mmol/l à +1H > 8,1 mmol/l à + 3H
Diabète gras	> 7,7 mmol/l a deux reprises	> 11 mmol/l	> 11 mmol/l
Intolérance au glucose	6,3 à 7,7 mmol/l	7,7 à 11 mmol/l	>11 mmol/l

## 6- Complications du diabète sucré

Le diabète une maladie lourde de conséquences par ses complications, c'est pourquoi il constitue un problème majeur de santé publique (Rahilly, 1997). C'est l'hyperglycémie chronique qui est responsable de complications à long terme micro- et macro angiopathique. Le diabète insulino-dépendant (DID) provoque des complications fonctionnelles (atteintes des yeux et des systèmes nerveux), peut-être plus précoces et plus sévères; et une complication vitale (atteinte rénale) plus fréquente chez les sujets jeunes. En revanche le DNID entraîne probablement plus de manifestation cardio-vasculaire (Perlemuter et al., 1999).

## 7- Traitement de diabète sucré

Le traitement du diabète de type 1 repose sur une prescription vitale l'insuline associée à la diététique, l'activité physique, l'auto-surveillance, l'éducation et le suivi médical régulier. (Gérard, 2005).

Le traitement initial du diabète de type 2 repose en 1<sup>er</sup> lieu sur le régime alimentaire et l'exercice physique. Les fonctions musculaires et articulaires diminuent les dépôts de graisse, en particulier abdominale, liés à l'insulinorésistance et ses conséquences avec fréquemment une perte de poids (AFSSPS, 1999).

En second lieu est les antidiabétiques oraux, qui entraînent la normalisation de la glycémie dans moins de 50% des cas. Ils n'ont pas d'effet régressif sur les lésions installées et ils sont contre - indiqués dans les insuffisances rénales et hépatiques. Leurs effets secondaires ne sont pas négligeables (Tossou et al., 1995).

Trois classes d'antidiabétiques oraux exerçant des effets hypoglycémiantes par des mécanismes d'action différents sont à la disposition des cliniciens prenant en charge des diabétiques de type 2 insuffisamment contrôlés par le régime seul:

- Les sulfamides hypoglycémiantes (Glibenclamide);
- Les biguanides (la metformine);
- Les inhibiteurs d' $\alpha$ -glucosidases intestinales représentés par l'acarbose et le miglitol (AFSSPS, 1999).

Les sulfamides hypoglycémiantes stimulent la sécrétion d'insuline sans influencer sa synthèse (Melander, 1996). Ils se lient à un récepteur spécifique sur la membrane des cellules  $\beta$ -pancréatiques. La liaison des sulfonylurées à leurs récepteurs spécifiques entraîne la fermeture des canaux potassiques ATP dépendant, source d'une dépolarisation membranaire et de l'ouverture secondaire des canaux calciques. L'afflux de calcium dans le cytoplasme des cellules  $\beta$ -pancréatiques induit l'exocytose des vésicules contenant l'insuline d'une façon similaire à celle observée après stimulation par le glucose (Harde et al., 1994). L'hypoglycémie est l'effet secondaire le plus grave associé à l'utilisation des sulfamides hypoglycémiantes (AFSSPS, 1999).

Les biguanides diminuent la production hépatique de glucose (inhibition de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse), favorisent la captation de glucose par le muscle et stimule la glycolyse. Les biguanides inhibent également l'absorption intestinale de glucose sans aucun effet sur la sécrétion d'insuline. Les effets secondaires sont une anorexie qui peut entraîner un amaigrissement modéré, un goût métallique, des nausées, des vomissements, une douleur abdominale ainsi qu'une diarrhée. L'effet indésirable le plus grave des biguanides est l'acidose lactique (Buyschaert, 2006; Gan et al., 1992).

Les inhibiteurs de l'absorption intestinale des glucides, Il s'agit de pseudo-tétracosaccharides d'origine bactérienne, ces analogues structuraux des oligosaccharides alimentaires inhibent de façon compétitive et réversible, les  $\alpha$ -glucosidases de la bordure en brosse de l'intestin grêle (glucoamylase, maltase, isomaltase et sucrase). Les inhibiteurs des  $\alpha$ -glucosidases intestinales ralentissent le clivage enzymatique des sucres alimentaires en mono et disaccharides, qui sont alors absorbés dans l'iléon, à ce niveau l'absorption du glucose après un repas est ainsi retardée dans le temps. Les inhibiteurs des  $\alpha$ -glucosidases sont essentiellement actifs sur l'hyperglycémie postprandiale (Reuser et al., 1994). Les effets secondaires de cette famille

---

sont d'ordres digestifs et parfois très invalidants (flatulences, diarrhées, douleurs abdominales... **(Gérard, 2005)**).

## 1- Utilisation de plantes médicinales

Depuis des millénaires, tous les peuples ont développé des médecines selon leur intelligence, leur génie, leur conception culturelle de la santé et de la maladie et les rapports qu'ils entretenaient avec leur environnement. **(Eddouks et al., 2007).**

A partir de 19<sup>e</sup> siècle, la phytothérapie acquiert une dimension plus rigoureuse, qui comprend l'examen botanique des végétaux, l'étude de leur composition chimique et de leur efficacité sur l'organisme. Il est aujourd'hui largement reconnu que le monde végétal constitue la source majeure de médicaments. En effet, près d'un quart des remèdes qui existent actuellement sont à base des substances végétales ou de produits de synthèse botanique et ceci grâce à leur richesse en produits dits du métabolisme secondaire. Ce sont des molécules variées permettant aux plantes de contrôler leur environnement animal et végétal. Parmi ces substances biochimiques qui procurent des propriétés curatives appréciables, et qu'aucune chimie de synthèse et combinatoire ne peut nous offrir, on cite : tanins, glucosides, mucilages, flavonoïdes, saponines, résines, gommages..., **(Farnsworth et al., 1985; Fabricant et al., 2001; Anne et al., 2008).**

Certains composés actifs responsables de l'activité pharmacologique ont été identifiés et isolés de plusieurs plantes, dont leurs mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets thérapeutiques ont été partiellement ou complètement élucidés **(Rates SMK, 2001).**

Actuellement, selon l'OMS (Organisation mondiale de la santé), plus de 80 % de la population mondiale, surtout dans les pays sous-développés, ont recours aux traitements traditionnels pour satisfaire leurs besoins en matière de santé et de soins primaires **(Eddouks et al., 2007).**

La médecine traditionnelle connaît de nos jours un regain d'intérêt et de nombreux diabétiques y ont régulièrement recours. Plus de 1200 espèces de plantes, utilisées en médecine traditionnelle, présentent des propriétés antidiabétiques. Cependant pour la plupart d'entre elles, les rapports scientifiques ne sont pas encore élucidés. **(Marles et Farnsworth, 1995; Kim et al., 2006).**

Il y a toute une série de plantes utilisées en médecine traditionnelle contre le diabète de type 2 sont essentiellement (tableau 2) : *Cinnamomum cassia*; *Punica granatum*; *Olea europaea*; *Eucalyptus globulus*; *Trigonella foenum-graecum*, *Rétama raetam* **(Rachid et al.2012).**

**Tableau 02 :** Liste de quelque plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète. (Rachid et al.2012).

Famille	(nom scientifique)	Nom vernaculaire	Nom en français	Parties utilisées	préparation
Lauraceae	<i>Cinnamomum cassia</i> <i>Lour.</i>	El Korfa	Cannelle	Partie Ariane	Decoc
Lythraceae	<i>Punica granatum</i> L.	Rommane	Grenadier	Péricarpe	Decoc, Powd
Oleaceae	<i>Olea europaea</i> L.	Zitoun, Zebouj	Olivier	feuilles, Fruits	Decoc, infu, huile
Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i> <i>Labill.</i>	Kalitouss	Eucalyptus	feuilles, Fruits	Decoc
Fabaceae	<i>Trigonella foenum- graecum</i> L.	Halba	Fenugrec	graine	Decoc, macera, powd
	<i>Retama raetam</i> ( <i>Forssk.</i> ) Webb	R'tum	Rétama	feuilles	Decoc

Decoc, Décoction; macera, macération; infu, infusion; poud, poudre.

## 2-Distribution géographique de *Retama raetam*

Les *Rétames* sont des légumineuses arbustives, occupant les zones arides, semi-arides et côtières, qualifiées de plantes fixatrices de dunes, leur nom dérive du nom biblique (ROTEM) qui fut changé par les arabes en (R'tem) ou (retam) (Zohary, 1962).

*Retama raetam* est fréquente dans le nord et l'est de la méditerranée et de la péninsule du Sinäï (Boulos, 1999; Mittler et al., 2001) .

En Algérie les *Rétames* occupent une surface considérable du nord vers le sud (Thomas, 1968), généralement localisé dans le sud oranais, sud de Djelfa, Ain Safra, Touggourt, au centre de la Kabylie, à l'est de Biskra et à Ouargla (Allal-benfakih, 2006). En Algérie le genre *Rétama* compte trois espèces : *Retama monosperma*, *Retama sphaerocarpa* et *Retama raetam*.

### 3- Systématique de *Retama raetam*

Selon Quezel et Santa (1962) les rétames sont classés dans le taxon suivant :

Règne :	végétal
Embranchement :	Spermaphytes
Sous embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Ordre :	Fabales
Super famille :	Légumineuses
Famille :	Fabacées
Sous famille :	Papilionacées
Genre :	<i>Rétama</i>
Espèces :	<i>R. raetam</i>

### 4- Description botanique

*Rétama raetam* (**Figure 01**), Arbuste saharien de 1 à 3,5 m de hauteur à rameaux veloutés, les fleurs blanches, grandes (8 -10 mm), en grappes pauciflores de 5 à10 fleurs; gousses ovoïdes, aiguës, terminées en bec. Les rameaux fortement sillonnés en long. Elle se trouve dans les dunes et lits des oueds (**Ozenda, 1991**), les feuilles sont très caduques, les inférieurs sont trifoliolés, les supérieurs simples et unifoliées (**Quezel et Santa, 1962**). La floraison de la plante de l'Avril au Mai (**Maghrani et al., 2003**).

Le fruit est une étroite gousse indéhissante de moins de 2 cm, acuminées, avec une extrémité aigue, portant une à deux graines (**Quezel et Santa, 1962**).



**Figure 01:** *Retama raetam* (Forssk.) Webb et Berth.

## 5- Importances de *Retama raetam*

La distribution géographique très diversifiée de la côte méditerranéenne jusqu'aux régions semi-arides et arides, *Retama raetam* possédant à la fois des intérêts pharmacologiques et écologiques intéressants.

### ➤ □ Intérêt écologique

Selon **Mittler et al. (2001)**, *Rétama raetam* s'adapte bien aux conditions les plus extrêmes de changements climatiques (manque de nutriments et stress hydrique), D'après **Farchichi, (1996)** *Rétama raetam* grâce à son potentiel germinatif élevé. Sa tolérance au stress hydrique et son mode de ramification radicalaire, peut être considéré comme une espèce pionnière apte à coloniser les cordons dunaires. Son utilisation dans les opérations de végétation de ces milieux fragiles est recommandable.

### ➤ □ Intérêt pharmacologique

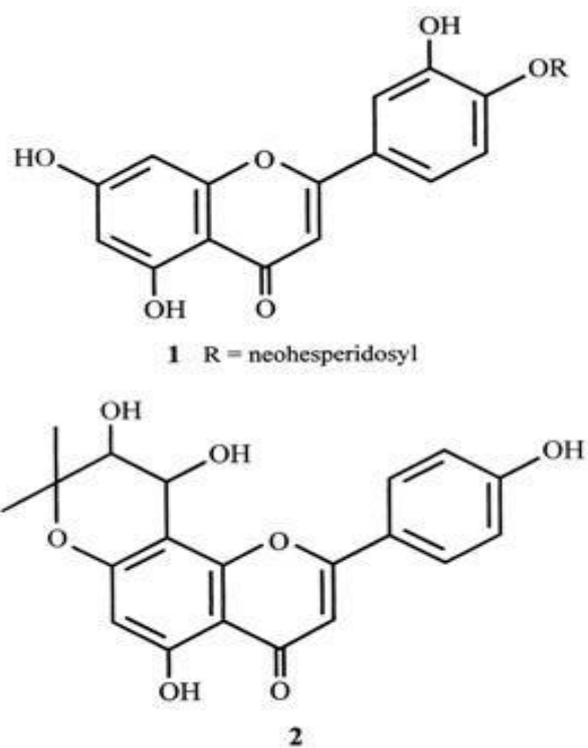
La partie aérienne de *Retama raetam* est utilisée, en infusion, en poudre ou en compresse, pour le traitement du rhumatisme, les blessures et les piqûres de scorpion, elle est utilisée aussi contre les morsures de serpent (**Chehema A, 2006**). En outre, des études expérimentales ont révélé que *Retama raetam* possède une activité antioxydante (**Saadaoui et al., 2007**), antimicrobienne et cytotoxique. Elle possède aussi un effet diurétique, antihypertenseur, et une activité hypoglycémiant (Eddouks et al., 2007 ; Maghrani et al., 2003, 2005b, 2005a).

## 6- Effet antidiabétique

Des recherches scientifiques sur le genre de *Retama*, ont montré que l'extrait aqueux de *Retama raetam* avait un effet hypoglycémiant; alors que l'administration orale d'une dose de 20 mg/kg de l'extrait aqueux de *Rétama raetam*, diminue de façon significative la glycémie des rats normaux, ainsi que des rats diabétiques (**Maghrani et al., 2003**). De même, *Rétama raetam* peut agir sur le métabolisme lipidique, selon **Maghrani et al., (2004)** l'administration oral de l'extraits aqueux de *Rétama raetam* provoque une diminution de la concentration des triglycérides dans le plasma des rats normaux et diabétiques avec une diminution significative du poids corporel.

## 7- Composition chimique

Selon des études phytochimiques *Retama raetam* est riche en flavonoïdes, alcaloïdes et en polysaccharides (**Abdel Halim et al., 1997**). Les graines contiennent de daidzéine, vicenin-2, la naringénine, l'apigénine, le kaempférol, la quercétine et le kaempférol 7-O-glucoside (**El-Sherbeiny et al., 1978**), la daidzéine, la daidzéine 7- 4'-diméthyl éther, chrysoeriol 7-O-glucoside et orientine sont présents dans les feuilles (**Abdalla et al., 1983**). Alors que la partie aérienne est riche en deux nouveaux flavonoïdes, lutéoline 4'-O-neohesperidoside (**1**) et 5,4'-dihydroxy— (3",4"-dihydro-3", 4"-dihydroxy)-2", 2"-diméthylpyrano-(5", 6": 7,8)-flavone (**2**) (**Kassem et al., 2000**).



**Figure 2:** structure de deux nouveaux flavonoïdes de *Retama raetam* (Kassem et al., 2000).

Dans plusieurs études épidémiologiques, la glycémie postprandiale (GPP) s'est avérée être un facteur de risque majeur et indépendant de maladie cardiovasculaire tant chez les intolérants au glucose que chez les diabétiques de type 2 (**Hanefeld et al., 1996; Hanefeld M, 2002**). Les personnes atteintes d'une faible tolérance au glucose ou de diabète ont souvent des taux de glycémie postprandiale élevés pendant de longues périodes (**Antonio et al., 2007**).

L' $\alpha$ -amylase est responsable de la dégradation des hydrates de carbone 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 .P, 2007**).

### 1-La digestion de glucides

Le but de la digestion est d'obtenir la transformation de tous les hydrates de carbone en sucre simple, hexoses ou pentoses, absorbables par la muqueuse intestinale (tableau1). Les produits de cette digestion intraluminaire sont ensuite traités comme les disaccharides naturels (lactose, saccharose) au niveau de la bordure en brosse des entérocytes où ils sont clivés en monosaccharides puis absorbés (**Blicklé et al., 1999**). La digestion salivaire permet, sous l'action de l'amylase, d'hydrolyser les longues chaînes d'amidon en polysides et diosides. La digestion intestinale est l'étape définitive, elle a lieu dans le Jéjuno-iléon puis dans le grêle. Elle permet d'obtenir des oses à partir de l'amidon restant, des polysides et diosides. Notons que le système enzymatique humain ne permet pas l'hydrolyse des liaisons  $\beta$  des polysaccharides complexes (cellulose), mais les enzymes bactériennes sont en mesure de réaliser cette réaction. En effet, seuls le glucose, le galactose, le fructose et le sorbitol peuvent franchir la barrière intestinale et passer dans la circulation sanguine (**Perlemuter et al., 2003**).

**Tableau 03:** Les enzymes de la digestion des sucres.

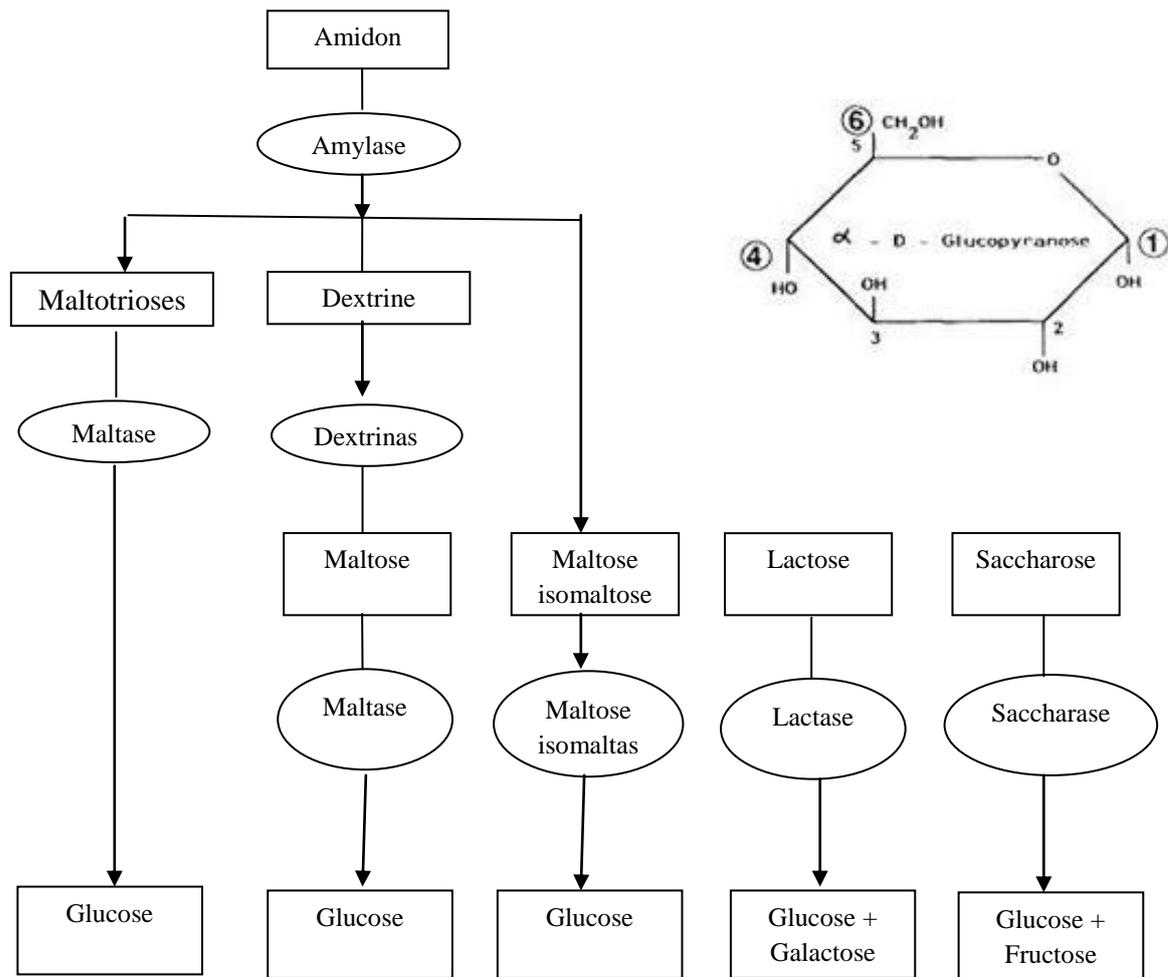
lieu	Enzyme	Sucre réduit	Sucre obtenu
Bouche	Amylase	Amidon	Polyosides
Jéjunum et intestin grêle	Amylase Maltase Saccharase Lactase Iso maltase	Diosides Saccharose Lactose Dextrines	Glucose Fructose + glucose Galactose + glucose Glucose

La digestion des glucides alimentaires fait appel à deux types d' $\alpha$ -glucosidases : les  $\alpha$ -amylases de la lumière intestinale et les  $\alpha$ -glucosidases de la bordure en brosse. Les  $\alpha$ -amylases hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1-4 de l'amidon, à l'exception de la dernière et de celle située au voisinage des liaisons  $\alpha$  1-6. Le deuxième système enzymatique, celui des  $\alpha$ -glucosidases de la bordure en brosse de l'entérocyte, hydrolyse les disaccharides alimentaires, qui atteignent le jejunum sans modification, et les résidus provenant de la digestion de l'amidon (**Blickle et al., 1999**).

## 2-Dégradation de l'amidon

La digestion de l'amidon commence dès la mastication sous l'influence de l' $\alpha$ -amylase salivaire. L'importance de cette enzyme n'est pas bien connue, car son activité est très vite inhibée par l'acidité du suc gastrique après la déglutition. La digestion de l'amidon est donc essentiellement effectuée par l' $\alpha$ -amylase pancréatique, enzyme majeure du suc pancréatique, qui clive l'amidon au niveau des liaisons  $\alpha$ -1-4 glucosidiques pour donner des oligosaccharides et des disaccharides. L'activité de cette enzyme dans la lumière duodénale est si importante que l'amidon est majoritairement transformé dès les premières anses jéjunales, permettant aux enzymes de la bordure en brosse des entérocytes de poursuivre très tôt la digestion des glucides (**Fogel et al., 1973**).

Au terme de l'action de l' $\alpha$ -amylases et des enzymes de la bordure en brosse entérocytaire, les glucides sont réduits à leur forme la plus simple, leurs trois monosaccharides constitutifs (**figure 3**) : le glucose (80 %), le galactose et le fructose (**Stéphane, 2008**).



**Figure 03:** Description schématique de la digestion des hydrates de carbone par les différents enzymes de tube digestif.

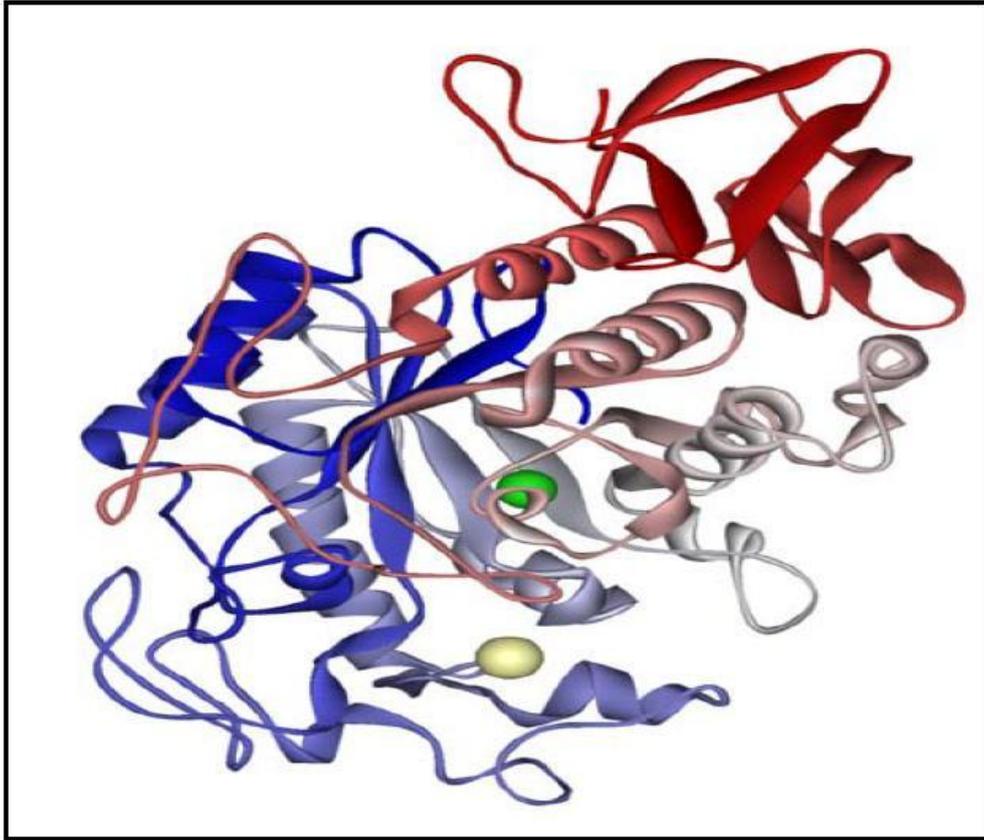
### 3-Structure d'alpha-amylase

Les  $\alpha$ -amylases (1,4- $\alpha$ -D-glucosyl-hydrolase, E.C.3.2.1.1) sont des enzymes monomériques, de poids moléculaire variant entre 41 et 78 kDa, retrouvées largement dans le règne vivant, aussi bien chez les animaux, les plantes supérieures que chez les microorganismes. Ces enzymes hydrolysent les liaisons glycosidiques  $\alpha$ -D-(1,4) internes de l'amidon, du glycogène et 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, obésité, etc.) faisant de ces enzymes des cibles thérapeutiques. A ce jour, 13 structures d' $\alpha$ -amylases de différents organismes ont été déposées. On dénombre ainsi cinq structures d' $\alpha$ -amylases de microorganismes,

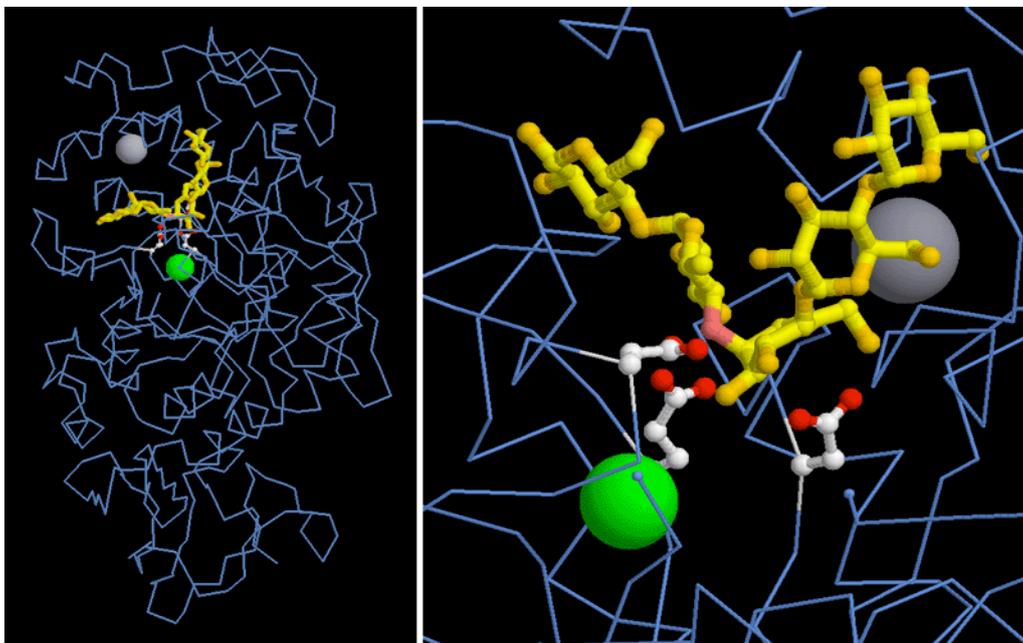
trois de mammifères (2 humaines et 1 porcine), 1 de ver, 2 de champignons et 2 de plantes (orge). Leurs structures tridimensionnelles ont toutes en commun un domaine catalytique central formé par un tonneau ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> appelé aussi « *TIM Barrel* » (**Banner et al., 1975**).

Les  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 (figure 1). 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' $\alpha$ -amylase est formée de 8 feuillets  $\beta$  plissés et de 8 hélices  $\alpha$  (**Chiba, 1988 ; Burhan, 2003**).

Le site actif d' $\alpha$ -amylase contient trois groupements d'acides aminés (de couleur blanche et rouge) 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 (de couleur jaune et orange) lié dans le site actif. (**PDB, 2006**) (**Figure 2**).



**Figure 04:** Diagramme en ruban de structure de l' $\alpha$ -amylase humaine présente les trois domaines (rose et gris: domaine A; bleu le domaine B, rouge domaine C) avec l'ion chlorure (vert) et l'ion calcium (jaune). (PDB,2006).



**Figure 05:** structure et le site catalytique de l' $\alpha$ -amylase créée 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).

## 5-Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action de l' $\alpha$ -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'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat (**Parkc et al., 1997**). Ce mécanisme est caractéristique de l'enzyme dans les conditions expérimentales telles que la  $T^\circ$  et le pH. (**Berry et Paterson, 1990**).

## 6-L'inhibition d'alpha amylase

L'inhibition des  $\alpha$ -amylases induit l'intolérance des carbohydrates, la satiété et la perte de poids, et prolonge le vide gastrique. ils ont ainsi un potentiel thérapeutique pour le traitement de l'obésité et du diabète non insulino-dépendant (**Gerrard et al., 2000**). Les niveaux de glucose des diabétiques peuvent être contrôlés après des repas par l'administration d'un inhibiteur d'amylase tel que l'acarbose. C'est un pseudotétracosaccharide qui a une forme proche de celle des oligosaccharides issus de la digestion de l'amidon. Il peut ainsi se lier aux sites des  $\alpha$ -glucosidases de la bordure en brosse intestinale et l' $\alpha$ -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 inclue les composés polyphénoliques et glyco-protéiques (**Tundis et al., 2010**). Comme les anthocyanines et ellagitannins présent dans la framboise et les fraises sont des inhibiteurs de l'activité d' $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase, respectivement. (**Mcdougall et al., 2005**). L'activité enzymatique de l'  $\alpha$ -amylase n'est pas modifiée par les ions  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$  mais elle est fortement inhibée par l'EDTA et les métaux lourds (**Igarashi et al., 1998 ; Talamondet al., 2002**).

## **Partie II : Matériel et Méthodes**

---

L'objectif de notre travail réalisé au sein de laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » est de tester *in vitro* l'effet de l'extrait des feuilles de *Retama raetam*, sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase. Pour cela, notre étude est réalisée comme suite:

- 1-Préparation des extraits aqueux et organiques à partir de la partie aérienne de la plante ;
- 2-Analyses phytochimiques, dosages de polyphénols et flavonoïdes totaux et chromatographie en couche mince (CCM) sur l'extraits préparés ;
- 3-Etude *in vitro* de l'effet des extraits préparés sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase.

### I-Préparation de l'extrait

#### I-1- Matériel végétal

Les feuilles de *Retama raetam* ont été récolté dans la région wade N'tissa, Beni-isguen wilaya de Ghardaïa, les feuilles de *Retama* sont séchées à l'aire libre dans le laboratoire pendant une semaine (**Figure -06 -**).



**Figure 06 :** Feuilles de *Retama raetam* séchées à température ambiante au laboratoire.

## I-2- Extractions

Les extraits utilisés au cours de notre études sont préparés selon plusieurs mode d'extraction : en macération ou sous reflux.

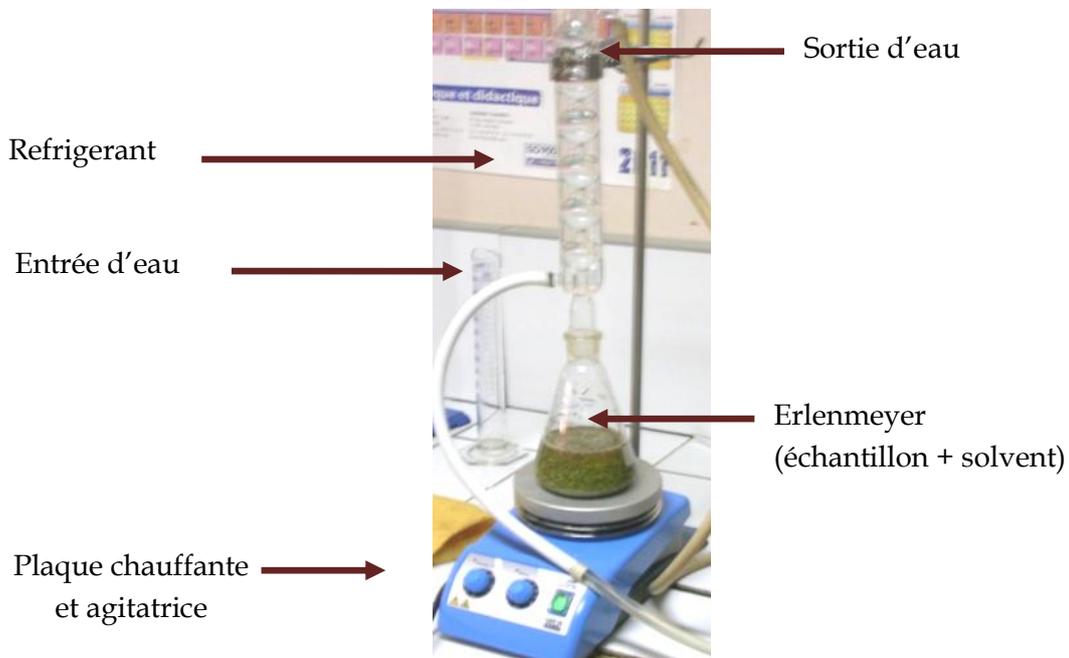
Les extraits préparés sont: extrait aqueux; extrait hydro-alcoolique (eaux acétone, eaux méthanol) et l'extrait organique n-butanol.

### I-2-1- préparation de l'extrait aqueux par macération (EA1)

- 10g de feuilles découpé en petit morceaux sont mise en macération à température ambient avec 100 ml de l'eau distille pendant 48h;
- L'extraction est réalisée par percolation 3 fois. Après extraction l'extrait est filtré;
- le filtrat récupéré est séché à sec.

### I-2-2- préparation de l'extrait aqueux sous reflux (EA2)

- ❖ Extraction sous reflux et à chaud (100° C) de 50 g de feuilles en présence de 300 ml d'eau distille pendant 20 minute (**Figure -07**);
- ❖ Filtration de la solution et récupération du filtrat;
- ❖ Evaporation à sec du filtrat.



**Figure 07:** Extraction sous reflux de feuille de *Retama raetam*

### ***I-2-3 préparations de l'extrait eau méthanol (EM)***

- Extraction sous reflux et à chaud (100° C) de 10g de feuilles dans 100 ml du mélange eau/méthanol (V/V : 20/80), pendant 20min;
- Filtration et récupération du filtrat;
- le filtrat est évaporé à sec;
- Le produit est récupère sur les parois de ballon d'évaporation.

### ***I-2-4 Préparation de l'extrait n-butanol (n-B1)***

Cet extrait est récupéré à partir de l'extrait eau-méthanol (EM). Après extraction et concentration de l'extrait, la phase aqueuse récupéré est extraite (liquide/liquide) par:

- Hexane pour éliminer les lipides et les chlorophylles (v/v);
- La phase aqueuse récupérée est traitée par l'acétate d'éthyle 3 fois (v/v) (liquide-liquide);
- La phase aqueuse récupérée est traitée avec le n-butanol 2 fois (liquide-liquide) ;
- Distillation de la phase organique pour éliminer le n-butanol (**Figure-10-**);
- Centrifugation et récupéré de l'extrait sous forme de culot.

### ***I-2-5 Préparation de l'extrait eau acétone (EAc)***

- Extraction sous reflux et à chaud (50° C) de 20g de feuilles en présence de 400 ml de mélange eau/acétone (V/V : 20/80), pendant 45min;
- Filtration et récupération du filtrat, le filtrat est évaporé à sec (**Figure -8-**);
- Le produit est récupéré sur les parois du ballon d'évaporation.

### ***I-2-6 préparation de l'extrait n- butanol (n-B2)***

Cet extrait est récupère à partir d'un extrait eau/acétone après concentration, la phase aqueuse récupérée est extraite (liquide/liquide) (**figure -9-**) par:

- Hexane pour éliminer les lipides et les chlorophylles (v/v);
- La phase aqueuse de l'hexane est décantée trois fois avec 70 ml d'acétate d'éthyle;
- La phase aqueuse de l'extrait acétate d'éthyle est décantée 2 fois avec 60 ml de n-butanol;
- Distillation de la phase organique pour éliminer le n-butanol (**Figure-10-**);
- Centrifugation et récupéré le produit sous forme de culot.



Figure 08: Evaporation a sec par le retavapor.

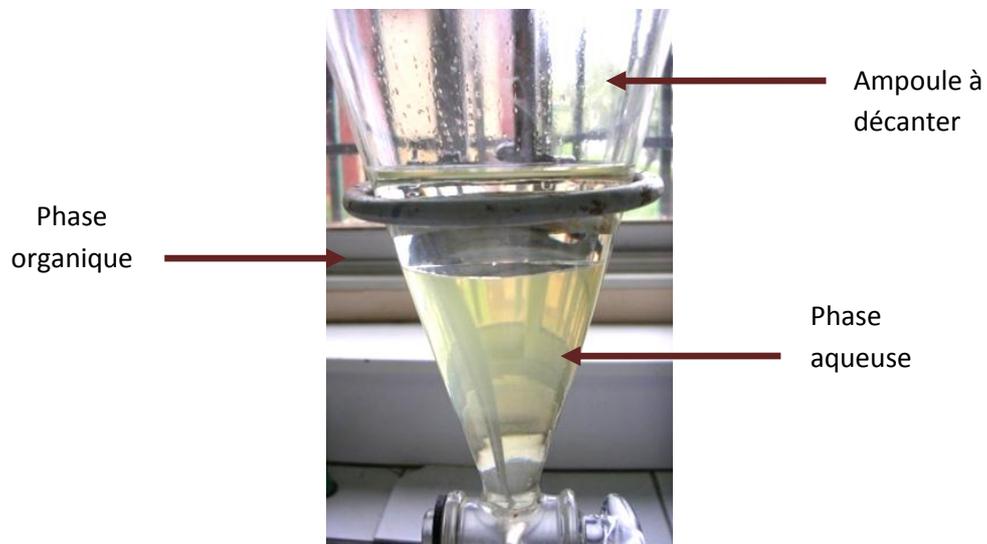


Figure 09: Montage de l'extraction liquide/liquide.

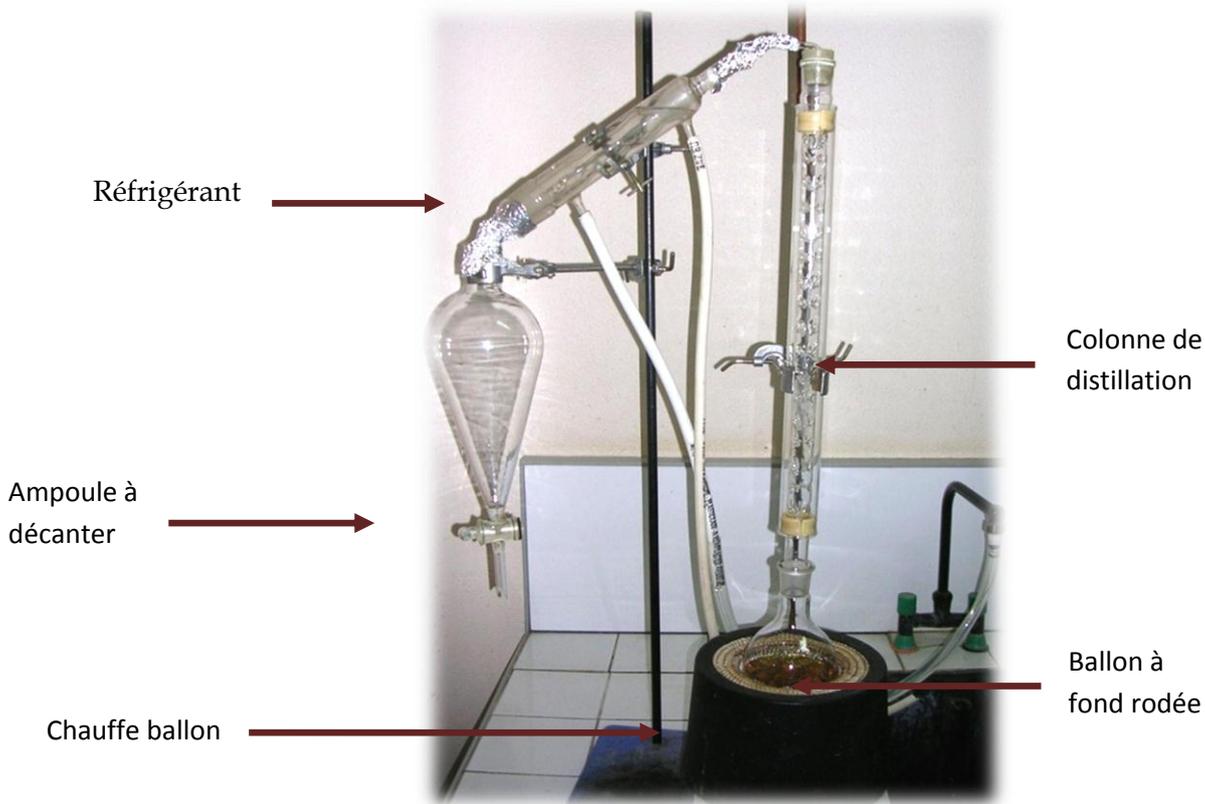


Figure 10: Montage de la distillation.

### I-3-Calcul du rendement

Le pourcentage de rendement pour chaque extrait a été calculé par la formule suivante:

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

(%) : Rendement exprimé en %.

**M**: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

**M<sub>0</sub>** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

## II- Analyses phytochimiques

### II-1- Tests phytochimiques

Les six extraits préparés ont fait l'objet de quelques tests phytochimiques à fin de détecter la présence ou l'absence de certaines familles chimiques. Pour cela nous avons réalisé sur nos extraits certains tests qualitatifs :

#### ❖ Les flavonoïdes [Karumi et al, 2004]

À 5 ml de chaque extrait, on ajoute quelques gouttes d'HCl concentré et quelques milligrammes de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange.

❖ **Les tanins** [Karumi et al, 2004]

Un volume de 2 ml de chacun des deux extraits, est additionné à 2 à 3 gouttes de la solution de  $\text{FeCl}_3$  à 1%. Après quelques minutes d'incubation, le chlorure ferrique développe une coloration verdâtre qui indique la présence des tanins catéchiques ou bleu-noirâtre qui révèle l'existence des tanins galliques.

❖ **Les alcaloïdes** [Majob, 2003]

Pour chaque extrait on réalise la procédure suivante : on ajoute 5 ml d'HCL 1% à 1ml de chaque extrait, le tout est chauffé au bain marie, puis on divise chaque extrait en deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Mayer, l'autre par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

Les réactifs de Mayer et de Wagner sont préparés comme suite :

- **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1.358 g d' $\text{HgCl}_2$  dans 60ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.
- **Réactif de Wagner** : Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2 g de KI et 1.27 g de  $\text{I}_2$ . Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

❖ **Les quinones libres** [Oloyede, 2005]

Sur un volume de chacun de nos extraits, quelques gouttes de NaOH à 1% sont ajoutées. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

❖ **Les terpénoïdes** [Edeoga et al, 2005]

À 5 ml de chaque extrait, on ajoute 2 ml de chloroforme et 3 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrée. La présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase.

❖ **Les coumarines** [Benmehdi, 2000]

Une quantité de quelques milligrammes de chaque extrait est solubilisée dans 2 ml d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont :

- La première représente un témoin ;
- La deuxième est traitée avec 0.5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10%.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines.

❖ **Les anthraquinones** [Oloyede, 2005]

À 10 ml de chacun de nos extraits, on ajoute 5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10% et on agite. L'apparition de couleur violette indique un test positif.

❖ **Les sucres réducteurs**

On ajoute 1 ml de liqueur de Fehling à 5 ml de chaque extrait. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité rouge brique.

❖ **Les amines**

On applique sur papier filtre une goutte de chaque extrait. Après séchage à 80°C dans l'étuve, le papier est pulvérisé avec une solution de la ninhydrine. Ensuite le papier est séché une 2<sup>ème</sup> fois dans l'étuve à 110°C pendant 5min, la présence des amines est observée sous forme d'une tache violette.

## II-2 - Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange. C'est une technique d'analyse qualitative qui nous permet de fractionner les extraits de *Retama raetam* afin d'avoir une idée sur leur composition chimique en utilisant certaines molécules pures comme témoins (acide gallique, myrcétine, catéchine et la quercétine)

Les essais de CCM sont réalisés sur nos extraits : l'extrait aqueux; les extraits hydro-alcoolique (eaux acétone, eaux méthanol) et l'extrait organique n-butanol.

20 mg de chaque extrait est solubilisé dans 1ml d'eau distillée pour les extraits aqueux, et dans un mélange eau/méthanol (1/1, v/v) pour l'extraits eau/méthanol et eau/acétone, alors que les extraits, n-butanol ont été solubilisé dans 1ml du méthanol. Les témoins utilisés sont: l'acide gallique, myrcétine, catéchine et la quercétine, préparés à 0.1 % dans le méthanol.

Les échantillons son disposé sur une plaque préparé de verre fluorescente recouverte d'une face de gèle de silice 64G (Fluka). Les éluant testés sont essentiellement:

- ✓ Méthanol: Acétate d'éthyle: Chloroforme: Eau (35/35/30/0.1)
- ✓ Chloroforme : Méthanol : Acétate d'éthyle: Eau (20/50/30/0.2); (30/50/20/0.2);
- ✓ Acétate d'éthyle : Chloroforme : Méthanol (80/23.5/20);
- ✓ Eau / Méthanol (30/70), (20/80), (40/60);
- ✓ Acétate d'éthyle : Chloroforme : Méthanol: Eau: (50/10/40/0.1); (20/50/30/3); (30/40/30/3);
- ✓ Acétate d'éthyle : Chloroforme : acide formique: (40/50/10);
- ✓ Acétate d'éthyle : Chloroforme : Méthanol: acide formique: (20/70/10/0.1).

Après migration du système sur la plaque CCM, on procède à la révélation des chromatogrammes par une lampe UV: 254,336 nm.

L'interprétation qualitative des chromatogrammes s'effectue par la détermination des facteurs de rétention  $R_f$ . La position finale de la tache (ou spot) est caractéristique de la molécule. On lui attribue une valeur, Elle dépend de la composition de l'éluant utilisé. Ce  $R_f$  est le rapport de la distance parcourue par le composé divisé par la distance parcourue par l'éluant.

$$R_f = \frac{X}{Y} = \frac{\text{Hauteur de la tache}}{\text{Hauteur du front du solvant}}$$

### II-3-Dosages de polyphénols [Boizot et charpentier, 2006]

La quantification des polyphénols totaux est réalisée par une méthode à base de Folin Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ); lors de l'oxydation des phénols, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux

Les extraits sont préparés à une concentration de 1mg/ml.

On prend une quantité de 100  $\mu$ l de chaque extrait et mélangée avec 2 ml d'une solution de carbone de sodium à 2%, puis agitation des tubes et on laisse les tubes pour l'incubation pendant 5 min. Ensuite, 100  $\mu$ l du réactif Folin Ciocalteu à 1N est ajouté. Après une 2<sup>ème</sup> incubation pendant 30 min à l'abri de la lumière, la lecture de la densité optique est réalisée à 700 nm contre le blanc.

Une gamme d'étalon est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations finales: 2.27, 4.54, 9.1, 13.63, 18.18, 22.72, 27.27  $\mu$ g/ml.

La concentration des polyphénols totaux présents dans nos échantillons exprimée En  $\mu\text{g}$  Eq d'acide gallique/mg de l'extrait est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Polyphenol}] = \frac{a.f}{b.v} .$$

**A:** concentration des polyphenol ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) détermine à partir de courbe étalon;

**F:** facteur de dilution (x22);

**B:** masse de l'extrait (1 mg);

**V:** volume initial de la solution d'extrait (1ml).

#### **II-4-Dosage de flavonoïdes totaux [Zhishen et al., 1999] in [Ardestani et Yazdanparast,2007]**

La quantification de contenu flavonoïque a été estimée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et la soude ( $\text{NaOH}$ ). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaun avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

Les extraits sont préparés à une concentration de 1mg/ml.

Un volume de 500 $\mu\text{l}$  de chaque extrait ou de catéchine sont mélange avec 2 ml d'eau distillée, et par la suite on ajoute 150  $\mu\text{l}$  d'une solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 15%. Après, incubation de 6 min à température ambiante, on ajoute au mélange 150  $\mu\text{l}$  de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 10% suivie par une 2<sup>ème</sup> incubation 6 min à température ambiante. Par la suite 2 ml d'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ) à 4 % est ajouté, le volume totale est complété à 5 ml d'eau distillée. Après agitation puis incubation pendant 15 min, la lecture se fait à 510nm contre le tube blanc.

Une gamme étalon est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations finales: 5, 10, 20, 30, 40, 50,60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### III - Tests in vitro de l'effet des extraits préparés sur l'activité d' $\alpha$ -amylase.

#### III - 1- Matériels

##### ✓ Réactif 3,5-dinitrosalicylique (DNSA)

Dans un Erlen Meyer, 1g de DNSA est solubilisé dans 40ml d'eau distillée. A cette solution 30g de tartrate double de sodium et potassium sont ajoutés sous agitation. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. L'addition de 20 ml d'une solution de NaOH 2N rend le réactif limpide d'une couleur orange. Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée et le réactif obtenu doit être conservé à l'abri de la lumière à +4°C.

##### ✓ Solution de l' $\alpha$ amylase

L'enzyme utilisé est l' $\alpha$ -amylase d'*Aspargillus oryza* (E.C.3.2.1.1) sous forme lyophilisée (Fluka), son poids moléculaire est de 51000 Da avec une activité spécifique de 26 UI/mg, conservée à +4°C.

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

##### ✓ Solution de substrat

Le substrat utilisé est l'amidon soluble de pomme de terre (Merk). La concentration de l'amidon préparé dans la solution tampon phosphate (0.02M, pH 6) afin de réaliser le test sur l' $\alpha$ -amylase. La concentration finale utilisée dans le milieu réactionnel est 0.4 mg/ml.

##### ✓ Solution des extraits de *Retama raetam*

Différentes concentrations des extraits de *Retama* sont préparées dans la solution tampon phosphate (0.02M, pH 6) afin d'évaluer leur effet sur l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase. Les concentrations finales utilisées sont : 1.6; 2.4; 3.2; 4.8 et 6.4 mg/ml.

#### III - 2- Méthodes

##### • Dosage des sucres réducteurs par la méthode de Benfeld (1955)

Cette méthode est basée sur le pouvoir réducteur des groupements aldéhydes et cétones libres des sucres. En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation de ces fonctions provoque

simultanément la réduction l'acide 3,5-dinitrosalicylique de couleur jaune orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique de couleur rouge orange qui absorbe à 540 nm.

L'intensité de la coloration varie selon la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel [Benfeld, 1955];[In Negi et Baner, 2006].

- **Mode opératoire**

- ✓ On prépare une série de tube à essai pour le test de réaction  $DO_B$  (en présence de l'extrait), on met un tube de contrôle ( $DO_A$ , sans extrait) et chaque tube a son tube blanc;
- ✓ On introduit 200  $\mu$ l de solution de l'enzyme  $\alpha$ -amylase (1.3 UI/ml incubée à 25°C). dans tous les tubes puis 200  $\mu$ l de l'extrait (pour chaque concentration). Dans les tubes contrôle, les extraits est remplacé par 200  $\mu$ l de solution tampon;
- ✓ On ajoute dans tous les tubes blanc 200  $\mu$ l de solution tampon;
- ✓ Quand le substrat introduit dans les tubes (sauf les tubes du blanc) on démarré le chronomètre;
- ✓ Après 5min d'incubation à 25°C, on arrête la réaction par 600  $\mu$ l de DNSA;
- ✓ Les tubes sont agités et placés dans un bain mari bouillant en même temps pendant 5 min;
- ✓ Ils ont immédiatement refroidis dans un bain d'eau glacée afin de stopper la réaction entre le maltose et le réactif DNSA;
- ✓ ajouter 1ml de l'eau distillée dans chaque tube, avec agitation;
- ✓ Les densités optiques sont lues contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY) à 540 nm.

L'inhibition d' $\alpha$ -amylase est exprimée par un pourcentage d'inhibition et calcule par l'équation suivant :

$$I\% = \frac{DO_A - DO_B}{DO_A} \times 100$$

$DO_B$ : la DO de tube d'échantillon.

$DO_A$  : la DO de tube de contrôle.

## **Partie III : Résultat et Discussion**

---

## 1-Rendement de l'extraction :

Les extraits préparés des feuilles *Retama raetam* par différentes méthodes d'extraction et différents solvants, ont fait l'objet de quelques tests phytochimiques. Les différents extraits obtenus (EA1, EA2, EM, EAc, n-B1 et n-B2) à différentes propriétés physico-chimiques qui sont présentes dans le tableau suivant:

**Tableau 4:** Caractéristiques des extraits de feuille de *Retama raetam*

caractéristique	Aspect	couleur	Solubilité	Rendement %
EA <sub>1</sub>	Poudre	Marron	Eau distille : totale Eau/MeOH (v/v): partiel; Méthanol: partiels.	12.2
EA <sub>2</sub>	Poudre	Jaune braient	Eau distille : totale Eau/MeOH (v/v): partiel. Méthanol: partiel.	6.06
EAc	hygroscopique	Marron foncée	Eau distille: partiels; Eau/MeOH (v/v): totale. Méthanol: totale.	12.8
EM	hygroscopique	Marron	Eau distille : partiel Eau/MeOH (v/v): totale. Méthanol: totale.	6.84
n-B <sub>1</sub>	hygroscopique	Marron	Eau distille : partiel. Eau/MeOH (v/v): partiel. Méthanol: totale.	0.68
n-B <sub>2</sub>	hygroscopique	Marron	Eau distille : partiel. Eau/MeOH (v/v): partiel Méthanol: totale	2.18

Selon les résultats du tableau on remarque que la plupart des extraits sont récupérés sous forme d'hygroscopique de couleur marron. Les extraits aqueux (EA1 et EA2) sont récupérés sous forme de poudre. Les rendements sont variable où les deux extraits EAc et l'extrait EA1 présentent le rendement le plus élevé de 12.8 %, 12.2 % respectivement, suivi par l'extraits EM et EA2 de 6.84 %, 6.06 %. Alors que les phases organiques n-B2 et n-B1 présentent de faible rendement 2.18 % et 0.68 %. De plus ces extraits présentent une bonne solubilité dans le méthanol à l'exception des extraits aqueux.

## 2-Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques est une analyse qualitative qui nous permet à mettre en évidence les différentes classes de métabolites secondaires que contienne la plante. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de colorations par des réactifs spécifiques de chaque famille de composés.

Les résultats expérimentaux de nos extraits motionnés dans le tableau n°5 montrent la présence ou l'absence de certains groupes chimiques. Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité, de turbidité ou de coloration, qui sont proportionnelle à la quantité de la substance recherchée.

**Tableau 5:** Résultats des tests pytochimiques réalisés sur les extraits de feuilles de *Retama raetam*.

		EA1	EA2	EAc	EM	n-B1	n-B2	
Composés phénoliques	<b><u>Tanins</u></b>	+ marron	-	+++ Bleu noire	+++ Bleu noire	-	-	
	<b><u>Flavonoïdes</u></b>	++ Orange claire	+ Orange claire	++ Orange	+++ Orange	++ Orange claire	++ Orange claire	
	<b><u>Quinones libre</u></b>	-	++ Jaune	+++ Jaune	+++ Jaune	+++ Jaune	+++ Jaune	
	<b><u>Coumarines</u></b>	++ Une tâche violette	-	-	+ Une tâche violette	+ Une tâche violette	+ Une tâche violette	
	<b><u>Anthraquinones</u></b>	- Jaune	- Jaune	- Jaune	- Jaune	- Jaune	+ Jaune	
Composés azotés	Alcaloïdes	Réactif de Wagner	++ Précipité marron	++ Précipité marron	++ Précipité marron	++ Précipité Marron	+++ Précipité marron	+++ Précipité marron
		Réactif de Mayer	++ Précipité blanc	++ Précipité blanc	-	+++ Précipité Blanc	+++ Précipité blanc	+++ Précipité blanc
<b><u>Terpénoïdes</u></b>		-	+ Interphase marron	-	++ Interphase marron	-	-	
<b><u>Sucre réducteur</u></b>		+ Précipité rouge break	++ Précipité rouge break	++ Précipité rouge break	+ Précipité rouge break	+ Précipité rouge break	++ Précipité rouge break	
<b><u>Amines</u></b>		+++	++	-	-	-	++	

+++ : Fortement positif / ++ : moyennement positive / + : faiblement positive - : absence totales

Selon les résultats du tableau n°5 les tanins sont présents en quantité importante dans les extraits EAc et EM avec une coloration bleu noire qui révèle l'existence des tanins galliques et faiblement positive dans l'extrait EA1 de coloration marron mais dans les extraits EA2, n-B1 et n-B2 les tanins sont totalement absents.

Les Flavonoïdes existent dans tous les extraits dont l'extrait EM est fortement positif alors que l'extrait EAc, l'extrait EA1, n-B1 et n-B2 sont plus ou moins positives mais l'extrait EA2 présent un test faiblement positif. Les quinones libres sont très importantes dans les extraits EM, EAc, n-B1, n-B2 par a port a l'extrait EA2 qui est moyennement riche en ces composée. Une absence totale notée dans l'extrait EA1. Les coumarines sont présents faiblement dans les extraits : EA1, EM, n-B1, n-B2. Alors que une absence totale dans les extraits EA2 et EAc est observée.

Les Anthraquinones sont pratiquement absents dans tous les extraits à l'exception de l'extrait n-B2.

Les alcaloïdes sont présents au niveau de tout les extraits de la plant à l'exception de l'extrait EAc qui révèle un test négatif avec le Réactif de Mayer;

Les terpénoïdes sont moyennement présents dans l'extrait EAc, et faiblement dans l'extrait EM. Mais totalement absent dans les autres extraits.

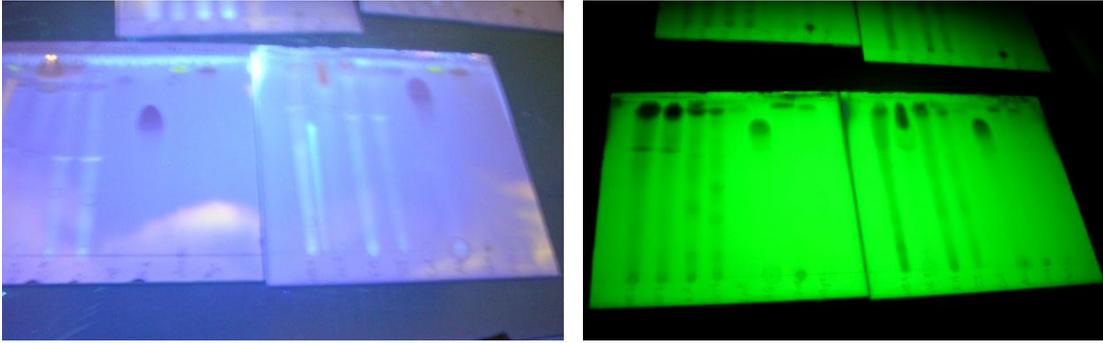
Les sucres réducteurs sont pratiquement présents dans tous les extraits de *Retama*.

Concernant les amines, ils sont fortement présents dans l'extrait EA1 et moyennement présents dans les extraits EA2 et la phase n-B2. Mais une absence totale est notée dans les extraits EAc, EM et n-B1.

### **3-Analyse chromatographique sur couche mince CCM**

Pour un essai d'analyse qualitative du contenu phénolique de nos différent extraits (EA1, EA2, EM, EA, n-B1 et n-B2), on a utilisé la chromatographie sur couche mince (CCM), qui est une méthode simple de séparation évidente à séparer les différents constituant d'un extrait végétal. On a utilisé plusieurs systèmes d'élution de polarité différente.

Suivant la révélation des plaques CCM, les spots ont été visualisés sous une lampe UV à deux longueurs d'ondes 254 et 366 nm, dont la première longueur d'onde révèle les taches non fluorescentes et visible que la seconde révèle les tâches fluorescentes. (Figure10)



**Figure 11:** Révélation de la plaque de CCM par la lampe UV aux deux longueurs d'onde 254 nm et 365nm.

Tableau 6 : les R<sub>f</sub> de chromatographie couche mince des extraits de *Retama raetam*

EA1	EA2	EAc	EM	n-B1	n-B2	Catéchine	Acide gallique	Quercétine	Myrcétine	
R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	
0.25 0.70	0.23 0.70 0.74	0.23 0.68 0.72 0.74 0.77	0.30 0.41 0.70	0.30 0.41 0.62 0.70	0.25 0.30 0.68 0.80 0.87	0.78	0.58	0.86	0.82	MeOH/Ad'éthyle/CH <sub>3</sub> C I <sub>3</sub> /Eau (35/35/30/0.1)
0.30 0.45 0.93	0.31 0.92	0.26 0.61 0.74 0.80 0.83 0.92	0.31 0.65 0.71 0.91 0.97	0.13 0.70 0.93	0.69 0.92	0.90	0.74	0.91	0.90	CH <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> / MeOH / A. d'éthyle /Eau (20/50/30/ 0.2)
0.30 0.45 0.93	0.31 0.92	0.10 0.35 0.92 0.96	0.31 0.65 0.71 0.91 0.97	0.13 0.70 0.93	0.69 0.92	0.94	0.83	0.96	0.94	CH <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> / MeOH / A.d'éthyle /Eau (30/50/20/ 0.2)
0.29 0.54	0.34 0.73	0.30 0.44 0.56 0.68 0.76	0.24 0.34 0.43 0.71	0.24 0.35 0.45	0.32 0.44 0.57 0.61 0.64 0.68 0.75	0.68	0.57	0.78	0.70	Acétate d'éthyle / chloroforme / Méthanol (80/23.5/20)
0.55	0.10 0.58 0.63 0.68 0.74 0.82 0.87	0.43 0.52 0.64 0.68 0.72 0.84 0.90	0.1 0.58	0.1 0.58 0.64 0.87	0.35 0.52 0.57 0.68 0.74	0.34	0.41	0.64	0.55	Ad'éthyle/ CHCl <sub>3</sub> /acide formique: (40/50/10)
0.08 0.21 0.46	0.44 0.55 0.65 0.83	0.07 0.46 0.55 0.68 0.82	0.43	0.44 0.84	0.10 0.14 0.22 0.28 0.52 0.65	0.15	0.21	0.52	0.41	Ad'éthyle/ CHCl <sub>3</sub> /MeOH/ acide formique: (20/70/10/0.1)

EA 1	EA2	EAc	EM	n-B1	n-B2	Catéchine	Acide gallique	Quercétine	Myrcétine	
R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	
0.41	0.38 0.84 0.93	0.31 0.44 0.67 0.73 0.94	0.30 0.43 0.68 0.92	0.93	0.75 0.94	0.94	0.90	0.76	0.80	Eau / Méthanol (30/70)
0.89 0.93	0.89 0.94	0.58 0.78 0.93	0.61 0.74 0.88 0.94	0.93	0.85 0.90	0.94	0.88	0.88	0.90	Eau / Méthanol (20/80)
0.88	0.38 0.84 0.93	0.18 0.40 0.47 0.64 0.70 0.94	0.17 0.28 0.37 0.49 0.61 0.94	0.29 0.35 0.94	0.40 0.70 0.78 0.94	0.94	0.90	0.69	0.75	Eau / Méthanol (40/60)
0.10 0.65	0.67 0.83	0.11 0.62 0.70 0.74 0.89	0.21 0.60 0.64	0.50 0.62 0.71	0.34 0.62 0.70 0.80	0.94	0.90	0.76	0.80	A. d'éthyle / CHCl <sub>3</sub> /MeOH / Eau (50/10/40/0.1)
0.29 0.55	0.23 0.37 0.54 0.62 0.76	0.24 0.56 0.63 0.81 0.85 0.88	0.23 0.37 0.49 0.68 0.76	0.22 0.29 0.57 0.63	0.20 0.24 0.30 0.57 0.64 0.77 0.82 0.84	0.65	0.49	0.78	0.72	A. d'éthyle / CHCl <sub>3</sub> /MeOH / Eau (20/50/30/3)
0.23 0.30 0.40 0.52 0.60	0.20 0.25 0.40 0.53 0.60 0.70 0.79 0.86	0.27 0.40 0.54 0.61 0.77	0.24 0.40 0.54 0.61 0.71	0.20 0.25 0.40 0.47 0.55 0.63	0.41 0.58 0.64 0.74 0.74 0.81	0.64	0.50	0.80	0.76	A. d'éthyle / CHCl <sub>3</sub> /MeOH / Eau (30/40/30/3)

**Tableaux 7:** Différents composant identifiés par CCM dans les extraits de *Retama raetam*.

	EA1	EA2	EAc	EM	n-B1	n-B2	
Catéchine	-	-	+	-	-	+	MeOH/A.d'éthyle/CH <sub>3</sub> C 1 <sub>3</sub> /Eau (35/35/30/0.1)
Acide gallique	-	-	-	-	-	-	
Quercétine	-	-	-	-	-	+	
Myrcétine	-	-	-	-	-	+	
Catéchine	+	-	+	+	+	+	CH <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> / MeOH / A. d'éthyle / Eau (20/50/30/ 0.2)
Acide gallique	-	-	+	-	-	-	
Quercétine	+	+	+	+	+	+	
Myrcétine	+	-	+	+	+	+	
Catéchine	+	+	+	+	+	+	CH <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> / MeOH / A.d'éthyle /Eau (30/50/20/ 0.2)
Acide gallique	-	-	-	-	-	-	
Quercétine	-	+	+	+	-	-	
Myrcétine	+	+	+	+	+	+	
Catéchine	-	-	+	-	-	+	Acétate d'éthyle / chloroforme / Méthanol (80/23.5/20)
Acide gallique	-	-	+	-	-	+	
Quercétine	-	-	+	-	-	-	
Myrcétine	-	-	-	+	-	+	
Catéchine	-	+	-	-	-	+	A.d'éthyle/CHCl <sub>3</sub> /acide formique: (40/50/10)
Acide gallique	-	-	+	-	-	-	
Quercétine	-	+	+	-	+	-	
Myrcétine	+	-	+	-	-	+	
Catéchine	-	-	-	-	-	+	A.d'éthyle/CHCl <sub>3</sub> /MeOH/ acide formique: (20/70/10/0.1)
Acide gallique	+	-	-	-	-	+	
Quercétine	-	-	-	-	-	+	
Myrcétine	-	-	-	-	-	-	

	EA1	EA2	EAc	EM	n-B1	n-B2	
Catéchine	-	+	+	+	+	+	Eau / Méthanol (30/70)
Acide gallique	-	+	+	+	+	+	
Quercétine	-	-	-	-	-	+	
Myrcétine	-	-	-	-	-	-	
Catéchine	+	+	+	+	+	-	Eau / Méthanol (20/80)
Acide gallique	+	+	-	+	-	+	
Quercétine	+	+	-	+	-	+	
Myrcétine	+	+	-	+	-	+	
Catéchine	+	+	+	+	+	+	Eau / Méthanol (40/60)
Acide gallique	+	-	-	-	-	-	
Quercétine	-	-	+	-	-	+	
Myrcétine	-	-	-	-	-	-	
Catéchine	-	+	-	-	-	+	A. d'éthyle/ CHCl <sub>3</sub> /MeOH/ Eau (50/10/40/0.1)
Acide gallique	-	+	+	-	-	+	
Quercétine	-	-	+	-	-	-	
Myrcétine	-	+	-	-	-	-	
Catéchine	-	-	+	-	+	+	A. d'éthyle/ CHCl <sub>3</sub> /MeOH/ Eau (20/50/30/3)
Acide gallique	-	-	-	+	-	-	
Quercétine	-	+	-	+	-	+	
Myrcétine	-	-	-	-	-	-	
Catéchine	-	-	-	+	+	+	A. d'éthyle/ CHCl <sub>3</sub> /MeOH/ Eau (30/40/30/3)
Acide gallique	+	-	-	-	-	-	
Quercétine	-	+	-	-	-	+	
Myrcétine	-	-	+	-	-	+	

(+) présence

(-) absence

L'étude de l'identification des composés phénoliques des extraits de notre plante *Retama raetam* et à l'aide de quelques témoins utilisés, nous a permis de mettre en évidence la présence ou l'absence de l'acide gallique qui est un acide phénolique et la catéchine, le quercétine et la myrcétine qui sont des flavonoïdes. On a utilisé 12 systèmes d'élution de polarités différentes pour cette identification.

A partir des résultats de deux tableaux 7 on constate que les meilleurs systèmes qui ont pu séparer les mêmes constituants dans les extraits: eau/méthanol (20:80) et chloroforme/méthanol/acétate d'éthyle/eau (20:50:30:0.2), mais dans le 2<sup>ème</sup> éluant il y a la présence des flavonoïdes et une absence d'acide phénolique.

Dans l'extrait n-butanol de la phase eau/acétone la majorité des éluants montrent qu'ils contiennent beaucoup plus des flavonoïdes que les acides phénoliques. Concernant les extraits EA1, EA2, EM, EAc et l'extrait n-B1 les résultats des deux tableaux montrent que la majorité des éluants indiquent qu'il y a une absence de polyphénols (flavonoïdes et acide phénolique) mais le tableau 6 montre bien que les extraits contiennent plusieurs tâches ( $R_f$ ), c'est-à-dire que notre extrait contient d'autres classes de métabolites secondaires.

En conclusion les différents extraits de *Retama raetam* selon les analyses chromatographiques, cette plante est riche en composés phénoliques à savoir les acides phénoliques (acide gallique) et flavonoïde (la catéchine, le quercétine et la myrcétine).

#### 4-Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux

Le taux en polyphénols et flavonoïdes totaux dans nos extraits de plante est représenté dans le tableau n°8.

On a établie une courbe d'étalon d'acide gallique (**figure 12**) pour le dosage des polyphénols et une courbe d'étalon de catéchine (**figure 13**) pour le dosage de flavonoïdes. La quantité en polyphénols totaux est exprimée en microgramme ( $\mu\text{g}$ ) équivalent acide gallique par milligramme (mg) d'extrait. De même la quantité en flavonoïdes totaux est exprimée en microgramme ( $\mu\text{g}$ ) équivalent catéchine par milligramme (mg) d'extrait.

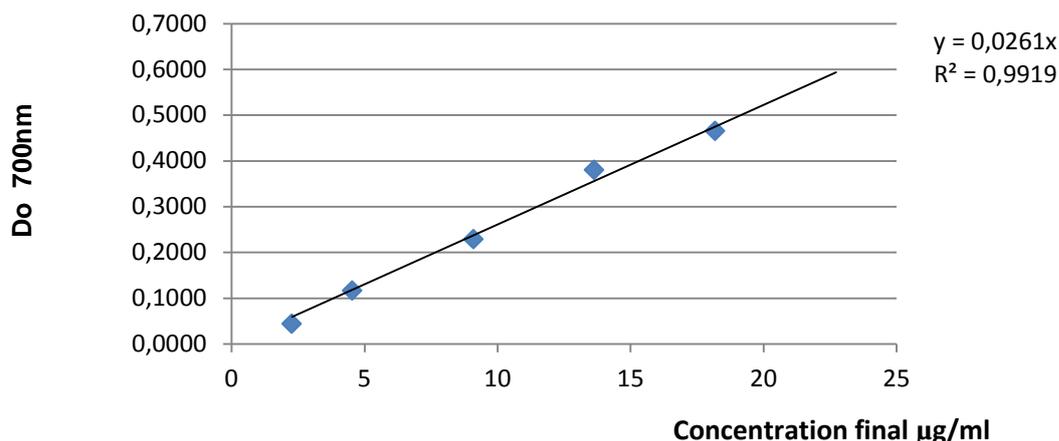


Figure 12: Courbe étalon de l'acide gallique.

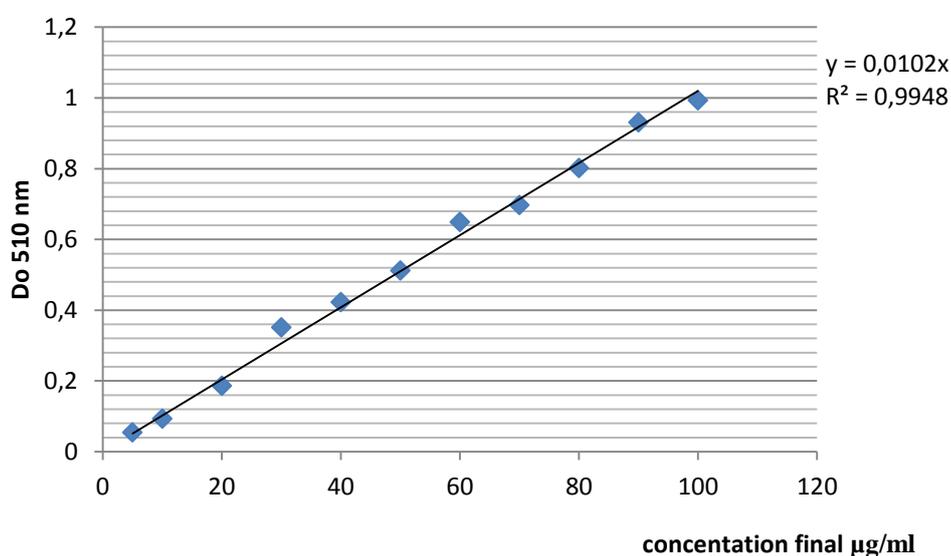


Figure 13 : Courbe étalon de la catéchine.

Tableaux 8: Le taux de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de *Retama raetam*.

	Polyphénols totaux		Flavonoïde totaux	
	µg. Eq acide gallique/mg de l'extrait	mg. Eq acide gallique/100g de matière végétale	µg. Eq catéchine/mg de l'extrait	mg. Eq catéchine/100g de matière végétale
<b>EA1</b>	255.53	3117.466	28.7	350.14
<b>EA2</b>	225.53	13.531	31.25	189.37
<b>EM</b>	269.07	1840.438	125.05	855.34
<b>EAc</b>	239.46	3065.088	104.02	1331.45
<b>n-B1</b>	272.46	185.272	119.66	81.36
<b>n-B2</b>	187	407.66	103.35	225.30

Les résultats du dosage de polyphénols totaux révèlent que les deux extraits n-B1 et EM sont les plus riches en composés phénoliques avec un taux de 272.64 et 269.07  $\mu\text{g}$  équivalent acide gallique par mg d'extrait respectivement, suivie par l'extrait EA1 avec un taux 255.53  $\mu\text{g}$  équivalent acide gallique par mg d'extrait puis l'extrait EAc et EA2 avec un taux de 239.46, 255.07  $\mu\text{g}$  équivalent acide gallique par mg d'extrait respectivement. Tandis que l'extrait n-B2 est le plus faible en composés phénolique avec un taux de 187  $\mu\text{g}$  équivalent acide gallique par mg d'extrait.

Le dosage de flavonoïdes totaux montre que la teneur la plus élevée est celle de l'extrait EM, il renferme 125.05  $\mu\text{g}$  .Eq catéchine/ mg de l'extrait, suivie par l'extrait n-B1 contient 119.66  $\mu\text{g}$  .Eq catéchine/ mg de l'extrait. Les deux extraits EAc et n-B2 sont presque les mêmes de taux 104.02 et 103.35  $\mu\text{g}$  .Eq catéchine/ mg de l'extrait, alors que l'extrait EA2 de taux 31.25  $\mu\text{g}$  .Eq catéchine/mg de l'extrait. Pour l'extrait EA1 contient une faible teneur en flavonoïde 28.7  $\mu\text{g}$  .Eq catéchine/ mg de l'extrait.

Le taux de polyphénols et de flavonoïdes dans 100 g de matière végétal est déterminé à partir de multiplication des résultats obtenue 1 mg de chaque extrait par son rendement, 12.2 %, 6.06 %, 12.8 %, 6.84 %, 0.68 % et 2.18 %; EA1, EA2, EAc, EM, n-B1 et n-B2 respectivement.

### **5- Effet des extraits de *Retama raetam* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro***

Afin de déterminer l'effet des extraits de *Retama raetam* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro*, nous avons testé l'effet de différentes concentrations de chaque extrait sur l'activité de l'enzyme avec fixation de concentration du substrat (l'amidon) à 2.5 g/l.

Les résultats représentés dans un tableau n°9 et 10 avec les DO mesurées, sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'enzyme.

**Tableaux 9:** Le pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase des extraits de *Retama raetam* et leur DO.

		1.6 mg/ml	2.4 mg/ml	3.1 mg/ml	4.8 mg/ml	6.4 mg/ml	DO <sub>A</sub>
<b>EA2</b>	Moyen de DO <sub>B</sub>	0.439	0.415	0.356	0.195	0.154	0.552
	<b>I%</b>	<b>20.45</b>	<b>24.15</b>	<b>30.50</b>	<b>64.76</b>	<b>72.10</b>	
<b>EM</b>	Moyen de DO <sub>B</sub>	0.577	0.466	0.422	0.446	0.228	0.6735
	<b>I%</b>	<b>14.26</b>	<b>30.75</b>	<b>37.29</b>	<b>32.24</b>	<b>66.12</b>	
<b>EAc</b>	Moyen de DO <sub>B</sub>	0.533	0.495	0.437	0.456	0.434	0.572
	<b>I%</b>	<b>6.81</b>	<b>13.46</b>	<b>23.60</b>	<b>21.27</b>	<b>24.12</b>	
<b>n-B2</b>	Moyen de DO <sub>B</sub>	0.6745	0.644	0.489	0.507	0.429	0.645
	<b>I%</b>	-	<b>0.23</b>	<b>24.24</b>	<b>21.45</b>	<b>33.54</b>	
<b>n-B1</b>	Moyen de DO <sub>B</sub>	0.662	0.576	0.501	0.499	0.345	0.536
	<b>I%</b>	-	-	<b>10.63</b>	<b>17.35</b>	<b>35.63</b>	
<b>EAI</b>	Moyen de DO <sub>B</sub>	0.747	0.746	0.8	0.697	0.672	0.634
	<b>I%</b>	-	-	-	-	-	

**Moyenne de DO<sub>B</sub>:** la DO de chaque tube (échantillon) est mesuré 3 fois.

**DO<sub>A</sub> :** la DO de tube de contrôle est mesurée 3 fois.

**Tableaux 10:** Le pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par les extraits de *Retama raetam*

	1.6 mg/ml	2.4 mg/ml	3.1 mg/ml	4.8 mg/ml	6.4 mg/ml
<b>EA2</b>	20.47 %	24.81 %	35.50 %	64.76%	72.10 %
<b>EM</b>	14.26 %	30.75%	37.29 %	32.24 %	66.12 %
<b>EAc</b>	6.81 %	13.46 %	23.60 %	21.27 %	24.12 %
<b>n-B2</b>	-	0.23 %	24.24 %	21.45 %	33.54 %
<b>n-B1</b>	-	-	10.63 %	17.35 %	35.63 %
<b>EAI</b>	-	-	-	-	-

Les résultats obtenus dans le tableau n°10 montrent que l'EA2 et EM ont un pourcentage d'inhibition plus élevé à forte concentration de chaque extrait, c'est 72.10 % et 66.12 %, par rapport aux autres extraits, suivies par les extraits organiques n-B1 et n-B2, qui inhibent l' $\alpha$ -amylase à moins de 50 % c'est 35.63 et 33.54 % respectivement.

L'extrait EAc a un faible pourcentage d'inhibition de 24.12 %, alors que l'extrait EA1 son pourcentage d'inhibition est indéterminé.

Les résultats d'inhibition de l'extrait EA2 révèlent que le pourcentage d'inhibition est proportionnelle à la concentration de l'extrait ce qui signifie qu'il y a une inhibition de l' $\alpha$ -amylase par l'extrait. En fonction de ces résultats, l'extrait EA2 présente un effet inhibiteur croissant en fonction de la concentration de l'extrait. Plus on augmente la concentration, plus le pourcentage d'inhibition est élevée, (20.47 %, 24.81 %, 35.50 %, 64.76 %) à forte concentration (6.4 mg/ml) il y a une forte inhibition de l' $\alpha$ -amylase 72.10 %.

Concernant l'extrait EM, EAc, n-B1 et n-B2 on observe aussi un effet inhibiteur croissant en fonction de la concentration de l'extrait, plus on augmente la concentration plus le pourcentage d'inhibition est élevé. Mais dans la concentration de 4.8 mg/ml il y a une diminution de l'inhibition puis une augmentation de l'activité à forte concentration 6.4 mg/ml.

L'extrait EA1 le pourcentage d'inhibition est négative à cause des  $DO_B$  obtenues au cours de cette étude (tableau 9), qui sont plus élevées par rapport au  $DO_A$  de contrôle, ce qui est impossible de déterminer le pourcentage d'inhibition en appliquant la formule  $DO_B - DO_A / DO_A \times 100$ , dans ce cas on suggère que cet extrait accélère la réaction entre l'enzyme et son substrat.

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

*Rétama raetam*, est une plante médicinale largement utilisée en médecine populaire. Au cours de notre étude nous nous sommes intéressés à la contribution de l'évaluation de l'effet de cette plante sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase, ceci afin d'initier d'autres recherches qui visent l'hyperglycémie postprandiale.

De ce fait, la présente étude a pour but de tester l'effet de différents extraits (EA1, EA2, EM, EAc, n-B1, n-B2) des feuilles de *Rétama raetam* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro*.

Au cours de la préparation des extraits, les rendements en masse de ces extraits EA1, EA2, EM, EAc, n-B1 et n-B2 sont variables, de ce fait, on constate que le rendement d'extraction dépend de la méthode d'extraction, et des caractéristiques physicochimiques des solvants utilisés, notamment leur polarité, il s'en suit que la solubilité des substances contenues dans la matière végétale dépend de ces propriétés.

Le criblage phytochimique des extraits (EA1, EA2, EM, EAc, n-B1, n-B2) des feuilles de *Retama raetam* a révélé la présence des alcaloïdes, flavonoïdes, quinones libres, coumarine et les sucres réducteurs dans la majorité des extraits. Alors que les tanins, terpénoïdes et les amines sont plus ou moins présents dans tous les extraits. L'anthraquinone a révélé une absence totale dans la majorité des extraits.

Selon des études phytochimiques *Retama raetam* est riche en flavonoïdes, alcaloïdes et en polysaccharides (**Abdel Halim et al., 1997**). Les graines contiennent de daïdzéine, vicénin-2, la naringénine, l'apigénine, le kaempférol, la quercétine et le kaempférol 7-O-glucoside (**El-Sherbeiny et al., 1978**), la daïdzéine, la daïdzéine 7-4'-diméthyl éther, chrysoeriol 7-O-glucoside et orientine sont présents dans les feuilles (**Abdalla et al., 1983**). Alors que la partie aérienne est riche en deux nouveaux flavonoïdes, lutéoline 4'-O-neohesperidoside et 5,4'-dihydroxy-(3'',4''-dihydro-3'', 4''-dihydroxy)-2'', 2''-diméthylpyrano-(5'', 6'': 7,8)-flavone (**Kassem et al., 2000**).

Nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par **Alghazeer et al., 2012** qui ont révélé une forte présence d'alcaloïdes et de flavonoïde dans l'extrait méthanolique de feuilles de *Retama raetam*, avec un test modéré pour les tannins, terpenoïdes, coumarines et les saponosides. Suivant ces résultats, on suggère que les tests phytochimiques sont des tests qualitatifs variables en fonction du mode d'extraction, le solvant utilisé et la partie de la plante étudiée.

Afin d'avoir une idée sur les différents composants chimiques qui peuvent être présents dans nos extraits, nous avons réalisé certains tests qualitatifs qui se basent sur une analyse chromatographique des extraits étudiés en utilisant certains témoins (acide gallique, catéchine, quercétine et la myrcétine).

Les résultats de la CCM ont révélé que les différents extraits de *Retama raetam* sont riches en composés phénoliques à savoir les acides phénoliques (acide gallique), flavonoïde (la catéchine, la quercétine et la myrcétine) avec la présence de certaines tâches qui ne correspondent pas aux témoins; il s'agit d'autres métabolites secondaires, ceci est confirmé par les résultats de tests phytochimiques réalisés sur ces extraits.

Parallèlement au screening phytochimique et la chromatographie sur couche mince (CCM) qui sont des tests qualitatifs, on a effectué le dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux dans nos extraits. Les résultats ont révélé que l'extrait n-B1 est riche en polyphénols avec un taux de 272.46 µg. Eq acide gallique/mg de l'extrait, alors que l'extrait EM est le plus riche en flavonoïde avec un taux de 125.05 µg. Eq catéchine/mg de l'extrait. Les extraits n-B2 et EA1, présentent de faibles concentrations en polyphénols et en flavonoïdes, 187 µg. Eq acide gallique/mg de l'extrait, 28.7 µg. Eq acide catéchine/mg de l'extrait respectivement.

De même **Alghazeer et al., (2012)** ont révélé que l'extrait méthanolique de feuille *Retama raetam* renferme de polyphénols et flavonoïdes environ 89.35 mg. Eq acide gallique/g de matière sèche et 45.23 mg. Eq rutine/g de matière sèche respectivement.

Ces résultats sont nettement inférieurs à nos résultats. Ces variations sont probablement liées à un facteur écologique qui concerne, l'espèce, le sol, le climat et les périodes de récolte. Ces facteurs peuvent jouer un rôle dans la teneur de ces composés phénoliques. Ceci est confirmé par l'étude de **Chehna, (2006)** qui révèle que l'extrait aqueux des feuilles de *Retama raetam* récolte dans la région de Ouargla sur quatre périodes saisonnières différentes:

Été, Automne, Hiver et le printemps présentent des taux variables de polyphénols de l'ordre 4.85 %, 3.555 %, 3.925 %, 4.455 % respectivement. Selon l'auteur, cette différence entre les résultats, peut être liée aux variations de facteurs climatiques, édaphiques et au stade du développement physiologique de plante (**chehema, 2006**).

Après la mise en évidence de différentes familles de composés chimiques et la quantification de polyphénols et flavonoïdes totaux dans nos extraits, nous avons étudié *in vitro* l'effet de ces extraits sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase. Les résultats obtenus ont démontré que les extraits EA2 et EM ont un pourcentage d'inhibition très élevé par rapport aux autres extraits qui ont un pourcentage d'inhibition moins de 50 % (EAc, n-B1 et n-B2).

Les inhibiteurs d'enzyme peuvent agir selon des mécanismes variés, en se combinant soit avec l'enzyme (compétitive avec le substrat ou incompétitive), soit avec le complexe enzyme-substrat (non compétitive), soit avec le substrat lui-même (**Weinman et al., 2004**). L'activité enzymatique peut être affectée de façon spécifique par de nombreux agents chimiques et les drogues tels que l'acarbose qui a une forme proche de celle des oligosaccharides issus de la digestion de l'amidon, il peut ainsi se lier aux sites de l' $\alpha$ -amylase pancréatique, inhiber puissamment, de façon compétitive et dose-dépendante (**Scheen et al., 2002**). Certaines plantes ont une activité inhibitrice enzymatique incluant les composés polyphénoliques et glyco-protéiques (**Tundis et al., 2010**). Plusieurs de ces polyphénols ont une action sur l' $\alpha$ -amylase tels que les tannins qui sont capables de se lier aux enzymes digestives et de les inhiber (**Kanda, 2004**).

En fonction de nos résultats obtenus sur l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase, on suggère que *Retama raetam* peut présenter un effet bénéfique sur l'hyperglycémie post-prandiale ou l'hyperglycémie des diabétiques.

Les travaux de **Maghrani et al., (2003)** ont démontré que l'administration orale de l'extrait aqueux de *Retama raetam* à une dose 20 mg/kg diminue significativement l'hyperglycémie chez les rats normaux, ainsi que les rats diabétiques. De même, *Retama raetam* peut agir sur le métabolisme lipidique, selon **Maghrani et al., (2004)** l'administration orale de l'extrait aqueux de *Retama raetam* provoque une diminution de la concentration des triglycérides dans le plasma des rats normaux et diabétiques avec une diminution significative du poids corporel. Ainsi, les travaux de **Algandaby et al., (2010)** ont démontré que l'administration orale quotidienne pendant quatre semaines de l'extrait méthanolique de fruits de *Retama raetam* à

une dose de 100, 250 et 500 mg/kg/jour, diminue significative l'hyperglycémie liée à une stimulation de la sécrétion d'insuline. Dans la même étude cet extrait inhibe *in vitro* significativement l'absorption intestinale de glucose et une augmentation non significative de la captation de glucose par les muscles.

Le dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux montre que l'extrait EA2 est faible en polyphénols et flavonoïdes alors que l'extrait EM est riche en flavonoïdes et en polyphénols, Par ailleurs les extraits n-B1 et EAc qui ont une quantité élevée en polyphénols et flavonoïdes inhibent faiblement l' $\alpha$ -amylase. De ce fait on constate que les polyphénols et les flavonoïdes ne sont pas les seuls molécules qui influent sur l'activité enzymatique d' $\alpha$ -amylase, c'est une synergie entre les différents métabolites présentés dans l'extrait, polyphénols, flavonoïdes, saponosides et d'autre molécule.

Ceci est confirmé par les travaux de **Algandaby et al., (2010)** qui ont démontré que l'extrait méthanolique de *Retama raetam* est basé sur la présence des alcaloïdes, flavonoïdes et des fibre soluble qui peuvent contribuer à la stimulation de la sécrétion de l'insuline et la réduction de l'absorption intestinale de glucose.

L'extrait EA1 qui contient une faible quantité en flavonoïde et moyennement en polyphénols et son effet inhibiteur sur l' $\alpha$ -amylase est indéterminé. En fonction de ces résultats on suggère que l'extrait accélère l'interaction enzyme/substrat, ou bien il a interféré avec le DNSA, d'où l'obtention de DO plus élevée par rapport aux témoins. Selon **Athel et al., (2004)** montre que de nombreuses réactions se caractérisent par un doublement de la vitesse quand la température est augmentée de 25°C à 35°C.

Dans le domaine de la phytochimie, qui s'est intéressé dernièrement à l'effet des plantes sur les plantes médicinales. Le mécanisme d'action des extraits de plante sur l'activité enzymatique n'est pas bien élucidé, ce qui forme un terrain pour de nouvelles recherches pour mieux élucider les principes d'interaction et d'inhibition à l'échelle moléculaire.

# Conclusion

---

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont révélé un effet inhibiteur intéressant des extraits de feuilles de *Retama raetam* (extrait aqueux et organique) sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase. Cette inhibition est proportionnelle à la concentration de l'extrait, plus en augment la concentration plus le pourcentage d'inhibition est importante.

Selon les résultats de l'analyse phytochimique des extraits testé cette activité est probablement liée à la richesse de cette plante en polyphénols et en flavonoïdes notamment l'acide gallique, catéchine, quercétine et myrcétine.

A la lumière de ces résultats cette étude nécessite d'éventuelles études qui s'intéressent à :

- Tester l'effet de ces extraits *in vivo* sur l'hyperglycémie postprandiale dans les rats normaux ;
- Tester *in vitro* l'effet de ces extraits sur l'absorption intestinale des glucides.
- Fractionner et identifier certains composants majoritaires dans cette plante et tester leur effet *in vivo* et *in vitro*.

# Référence Bibliographique

---

**Abdel Halim, O.B., Abdel Fattah, H., Halim, A.F., Murakoshi, I., (1997).** Comparative chemical and biological studies of the alkaloidal content of Lygos species and varieties growing in Egypt. *Acta Pharm. Hung.* 67 (6), 241–247.

**Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSPS).**Traitement Médicamenteux du Diabète de Type 2 - Février 1999.

**Algandaby MM, Alghamdi HA, Ashour OM, Abdel-Naim AB, Ghareib SA, Abdel-Sattar EA, Hajar AS. (2010).** Mechanisms of the antihyperglycemic activity of Retama raetam in streptozotocin-induced diabetic rats. 48: 2448-2453.

**Alghazeer R, El-Saltani H, Saleh N, Al-Najjar A, Habail F. (2012).** Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. *Natural Science*; 4: 324-335.

**Allal-benfakih. I. (2006).** Recherche quantitatives sur le criquet migrateur *Locusta migratoria* (Orth.Oedipodinae) dans le Sahara algérien. Perspectives de lutte biologique à l'aide de microorganismes pathogènes et de peptides synthétiques .thèse de doctorat N°17-2006.UNIV de limoge. Laboratoire UMR INRA 1061 Institut National Agronomique d'El Harrach. p27.

**Anne-sophie, Nogaret-Ehrhart. (2008).** la phytothérapie se soigner par les plantes. 3<sup>ème</sup> tirages. Paris: Eyrolles pratique.

**Antonio Ceriello et Stephen Colagiuri. (2007).** Directive pour la gestion de la glycémie postprandiale. *Diabetes Voice*; 52 (3): 9-11.

**Ardestani A, yazdanparast R, (2007).** Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teurcin polin* on in vitro protein glycosidation. *Food and chemical toxicology*; 45:2402-2111.

**Athel C-B, Marc J, Valdur S. (2005).** Cinétique Enzymatique. Suisse : EDP Sciences.

**Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., and Waley, S. G. (1975) .** Structure of chicken muscle triose phosphates isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution: using amino acid sequence data. *Nature* 255, 609-614.

**Beck-Nielsen H, Groop LC. (1994).** Metabolic and genetic characterization of prediabetic states.Sequence of events leading to non-insulindependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*; 94: 1714-21.

**Benfeld P (1955).** Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Meth.Enzymologie*; 1: 149-58.

# Référence Bibliographique

---

**Benmehdi, H ; (2000).** Valorisation des plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Thèse de Magister. Chimie organique appliquée. Université de Tlemcen.

**BERRY D.R. ET PATERSON A. (1990).** Enzymes in food industry. P. 306-351. In Suckling C.J. Enzymes chemistry impact and application. Ed. Chapman H. London.

**Blicklé J.F, Andres .E, Brogard. I.M. (1999).** Actualités dans les traitements du diabète de type 2. Les inhibiteurs des alpha-glucosidases; Rev Méd Interne; 20 [3] : 379-83.

**Blicklé J.F, Andres E., Brogard J.M., (1999).** Actualités dans le traitement du diabète de type 2. L'inhibition des alpha-glucosidases. Rev Med interne; 20 suppl 3: 379-83.

**Bonora E, Corrao G, Bagnardi V, (2006).** Prevalence and correlates of postprandial hyperglycaemia in a large sample of patients with type 2 diabetes mellitus. Diabetologia; 49: 846-54.

**Boulos, L., (1999).** Flora of Egypt, Azollaceae-Oxalidaceae. Cairo, Egypt: Al-Hadara Publishing, Vol.1, pp. 258–259.

**Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A., Gulnaz O. (2003).** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an *alkaliphilic Bacillus sp.* Isolate ANT-6. Process Biochemistry. (38): 1397-1403.

**Buyschaert M. (2006).** Diabétogène clinique. De book; 153: 135.

**Buyschaert M., Vandeleene B., Parus I., Hermans MP., (1999).** Le diabète sucré d'une réalité d'aujourd'hui à un défi de demain. Louvain Med.118: S189-S195.

**Calop J., Limat S., Frnandez C., (2008).** Pharmacie clinique et thérapeutique. 3<sup>ème</sup> Ed. Masson, Elsevier Masson, Paris. pp.417-427.

**Ceriello A. (2005).** Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat Diabetes; 54: 1-7.

**Chehma Abdelmadjid, (2006 a).** Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Dar Elhouda. 140:87.

**Chehma Abdelmadjid, (2006 b).** Phytomasse et valeur nutritive des principaux plants spontanés vivaces du Sahara septentrional agrairien. Université Kasdi Merbeh Ouargla.

# Référence Bibliographique

---

- Chiba S. (1988).** Amyloglycosidase. In: Handbook of Amylases and related enzymes (The Amylase Research Society of Japan, éd.). Pergamum Press, Oxford, U.K. pp 104-116.
- De Smet ,PA. (2002).** Herbal remedies. N Engl J Med; 347(25): 2046-57.
- Dowse GK, Zimmet PZ, Collins VR. (1996).** Insulin levels and the natural history of glucose intolerance in Nauruans. Diabetes; 45: 1367-72.
- 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. Springer Phytothérapie 5: 194–203.
- Eisenberg DM, Kessler RC, Foster C, et Norlack FF, Calkins, D et Delbanco L. (1993).** Unconventional medicine in the United States. N Engl J Med; 328: 246-52.
- El-Sherbeiny AEA, El-Sissi HI, Nawwar MAM, El-Ansari MA. (1978).** ethnomedical approach to the identification of news drugs for the Planta. Med; 34:335.
- Fabricant DS, Farnsworth NR, (2001).** The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environ Health Perspect; 109: 69-75.
- Fabrice Bonnet, Martine Laville. (2005).** Le syndrome métabolique : définition, épidémiologie, complications ; Spectra Biologie; 29(145): 27-29.
- Farchichi, A., (1996).** La lutte contre l'ensablement et pour la stabilisation des dunes: Essai de la fixation biologique des dunes en Tunisie présaharienne. Recherches sur la désertification dans la Jeffara. Rev. Tunis. Geogr. 12: 49–102.
- Farnsworth, N.R., Soejarto, D.D. (1985).** Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. Econ. Bot. 39 : 231–40.
- 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 intra-luminal process not requiring membrane digestion. J Appl Physiol, 35, 263-267.
- Gan S, Barr J, Aireff A. (1992).** Biguanide associated lactic acidosis: case report and review of litterature. Arch Intern Med; 152: 2333-2336.

# Référence Bibliographique

---

- Gérard Raverot. (2005).** Endocrinologie métabolisme réanimation – urgences, Diabète sucre de types 1 et 2 de l'enfant et de l'adulte. Servier; 63: 4.
- Gerrard, J.A., Prince, M.J. and Abell, A.D., (2000).** Kinetic Characterisation of EneDiol-Based Inhibitors of  $\alpha$ -Amylase, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1575-6.
- Goetz .P. (2007).** Phytothérapie du diabète. Springer; 5: 212–217.
- Hanefeld M et coll (1996).** Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. Diabetologia. 39:1577-83.
- Hanefeld M. (2002).** Postprandial hyperglycaemia: noxious effects on the vessel wall. Int J Clin Pract Suppl; 129: 45-50.
- 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  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. Applied and Environmental Microbiology 64 (9): 3382-3389.
- Iiarde A, Tuck M. (1994).** Treatment of non insulin-dependent diabetes mellitus and its complications states of the art review. Drugs and Aging; 4: 470-491.
- Institut National de Santé Publique (INSP). (2005).** Projet TAHINA (Transition épidémiologique et impact sur la santé en Afrique du Nord), enquête nationale de santé (Contrat N° ICA3-CT-2002-10011).
- International Diabetes Federation (IDF).** Diabetes Atlas, third edition, Bruxelles:International Diabetes Federation. 2006.
- Jacques Quevauvilliers, Alexandre Somogyi , Abe Fingerhut. (2007).** Dictionnaire médical de poche. Elsevier Masson; 524: 153.
- Jayakar B, Suresh B. (2003).** Antihyperglycaemic effect of *Aporosa Lindleyana* in normal and alloxan induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology; 84(2-3), 247-249.
- Kandra L, Gyeman G, Zajaez A, Batta G. (2004).** Inhibitory effects of tamnius of human salivary  $\alpha$ -amylase. Biochem. Biophys. Res commun. 319 (4): 1265-71.
- Karumi, Y; Onyeyili, P.A; Ogugb uaja, V.O; (2004).** Identification of active principales of balsamina (Balsam apple) leaf extract. J. Med. Scien. 4: 179-182.

# Référence Bibliographique

---

- Kassem .M, Mosharrafa .S.A, Saleh.N.A.M, Abdel-Wahab S.M, (2000).** Two new flavonoids from *Retama raetam*. *Fitoterapia*; 71: 649-654.
- Kim S. H., Hyun S. H., Choung S. Y., (2006).** Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *Journal of Ethnopharmacology*; 104: 119–123.
- Maghrani, M., Lemhadri, A., Jouad, H., Michel, J.B., Eddouks, M., (2003).** Effect of the desert plant *Retama raetam* on glycaemia in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol*; 87, 21–25.
- Maghrani, M., Lemhadri, A., Zeggwagh, N.A., El Amraoui, A., Haloui, M., Jouad, H., Eddouks, M., (2004).** Effect of Retamaraetam on lipid metabolism in normal and recent-onset diabetic rats. *J. Ethnopharmacol*; 90, 323–329.
- Maghrani, M., Michel, J.B., Eddouks, M., (2005b).** Hypoglycemic activity of *Retama raetam* in rats. *Phytother. Res*; 19, 125–128.
- Maghrani, M., Zeggwagh, N.A., Haloui, M., Eddouks, M., (2005a).** Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. *J. Ethnopharmacol*; 99, 31–35.
- Majob F., Kamalinejab M., Ghaderi N., Vahidipour H.R., (2003).** Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranien Journal of Pharmaceutical Research*. 77-82.
- Marles R.J., Farnsworth N.R., (1995).** Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: 137-189.
- Mcdougall GJ, Stewart D. (2005).** The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*, 23:189-195.
- Melander A. (1996).** Oral anti-diabetic drugs: an overview. *Diabetic Medicine*; 13: S143-S147.
- Mesbah S,** Relative a la célébration de la journée mondiale du diabète Ministère de la santé de la population et de la reforme Hospitalière. Direction de la prévention. Instruction N° 07 du 31 OCT 2010.
- Mittler R ; Merquiol E ; Hallak-Herr E ; Rachmilevitch S; Kaplan A ; Cohen M ; (2001).** Living under a “dormant” canopy: a molecular acclimation mechanism of the desert plant. *Retamaraetam.Plant J*; 25: 407–416.
- Msante, (2011).** Diabète 3<sup>ème</sup> cause de cécité en Algérie. *Rev Infosoir*.

# Référence Bibliographique

---

**Niskanen L, Turpeinen A, Penttila I, Uusitupa MI. (1998).** Hyperglycaemia and compositional lipoprotein abnormalities as predictors of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: a 15-year follow-up from the time of diagnosis. *Diabetes Care*; 21: 1861-9.

**Oloyede, O.I; (2005).** Chemical Profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan journal of nutrition*. 4: 379-381.

**OMS.** Diabète. Aide-mémoire N°312, novembre 2009.

**Oubré AY, Carlson TJ, King SR, Reaven GM. (1997).** From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. *Diabetologia*, 40:614-617.

**Ozenda Paul, (1991).** Flore et végétation du Sahara. 3<sup>ème</sup> édition Paris : CNRS EDITION.

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

**Perlemuter .L; J.-L. Sélam; G.collin de l'Hortier. (2003).** Diabète et maladies métaboliques. *masson*; 407(4):18.

**Perlemuter.l , Ledoyen .S. (1999).** Complications chroniques du diabète. *Impact internat*; 200: 49-57.

**Quezel et Santa ; (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie. Tome I.p 156-162.

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

**Rachid Azzi , Djaziri Rabah, Lahfa Farid, Sekkal Fatima Zohra, Benmehdi Houcine, Belkacem Nacéra, (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* Vol. 6(10), pp. 2041-2050.

**Radermacherl, D'ORIO V. (2005).** URGENCES MÉDICALES EN DIABÉTOLOGIE : L'acidocétose et le coma hyperosmolaire. *Rev Med Liege*; 60:5-6: 466-471.

**Rahilly .O. (1997).** Non-insulin dependant diabetes mellitus: the gathering storm. *BMJ*; 314: 955-959.

**Ramachandran A, Snehalatha C, Viswanathan V, Viswanathan M, Haffner SM. (1997).** Risk of noninsulin dependent diabetes mellitus conferred by obesity and

# Référence Bibliographique

---

central adiposity in different ethnic groups : a comparative analysis between Asian Indians, Mexican Americans and whites. *Diabetes Res Clin Pract*; 36: 121-5.

**Rates SMK, (2001).** Plants as source of drugs. *Toxicon*; 39: 603-13.

**Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus (ECDCDM). (1997).** *Diabetes Care*; 20: 1183-1197.

**Reuser A, Wisselaar H. (1994).** An evaluation of the potential side-effects of alphaglucohydrolase inhibitors used for the management of diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*; 24 (suppl 3): 19-24.

**Saadaoui.B et al., (2007).** Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien. *Revue des régions arides*. pp.316-321[6 page(s) (article)]. Édition. : Institut des régions arides, Médenine, Tunisie.

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

**Singh D. (2008).** Comment mettre en œuvre des programmes de prise en charge des maladies chroniques en tenant compte de la diversité des contextes et des prestataires de soins. Synthèse rédigée pour la Conférence ministérielle européenne de l'OMS sur les systèmes de santé. Tallinn (Estonie) 25-27. 35p.

**Stéphane Lecleire, (2008) .**Digestion et Absorption des Nutriments, *Cah. Nutr. Diét.*, 43, 1.

**Talamond P., Desseaux V., Moreau Y., Santimone M. Marseillemouren G. (2002).** Isolation, characterization and inhibition by acarbose of the alpha-amylase from *Lactobacillus* fermentation: comparison with *Lb.Manihotivorans* and *Lb.Plantarum* amylases. *Comp Biochem. Physiology. Biochem. Mol Biol.*, 133 (3): 351-60.

**Nauck MA, vardarli I, Deacon CF, Holst JJ, Meier. (2009).** Diabete: a global threat, *Lancet*, 373:1735-72.

**Thomas, J.P., (1968).**Ecologie et dynamique de la végétation de la dune littorale dans la région de Djidjelli. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr.nord*; 59: 37-98.

**Tossou, K., Sess, D., Adran A. (1995).**Intérêt et place de la médecine traditionnelle dans le traitement du diabète sucré. Résultats préliminaires. In *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine, CAMES*, pp. 19-28, treatment of NIDDM. *Diabetologia*;40: 614-7.

# Référence Bibliographique

---

**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.

**Vermerieu W, Nicholson R, (2006).** Isolation and identification of phenolic compounds, *compound biochemistry*, published by Springer, Dordrecht, 35-62-151-191.

**Weinman sege, Pierre Méhul. (2004).** *Toute la Biochimie*. Paris: Dunod.

**Zhishj, Mengheng T, Jainming W, (1999).** The determination of flavonoid contents mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chem.* 64: 555-9.

**Zohary Michael, (1962).** *Plant life of Palestine, Israel, and Jordan*, Ronald, New York. *Science* 11 may: Vol. 163. no.3515, p.523. DOI:10.1126/science.136.3515.523.