

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie appliquée



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Activité anti-enzymatiques des plantes de la région de la Kabylie

Présenté par :

M^{elle} BECHROUNE Katia & M^{elle} LARAB Amel

Soutenu le : **26 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M^{me} ARKOUB L.	MCB	Président
M^{me} KHETTAL B.	MAA	Encadreur
M^r TACHERFIOUT M.	MAA	Examineur

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciement

Nous remercions, en premier lieu, Dieu pour le courage, la patience et la santé qu'il nous a donnée pour suivre nos études.

Le travail fait partie de projet de recherche du laboratoire de Biotechnologie végétale et Ethnobotanique de la faculté sciences de la nature et de la vie de l'université de Bejaia.

Notre profonde gratitude va :

A notre promotrice M^{me} KHETTAL B pour son encadrement, son suivi et ces conseils tout au long de cette période.

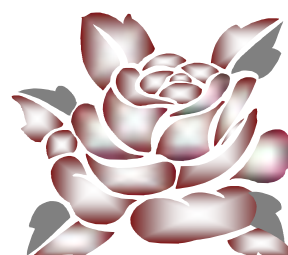
Aux membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en jugeant notre travail : M^{me} ARKOUB L d'avoir accepté de présider le jury et M^r TACHARFIOUT d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous exprimons nos sincères remerciements à Mr ADJAOUDE A pour nous avoir fournis les substrats de l'acétylcholinestérase.

Nos remerciements s'adressent également à l'ensemble du personnel du laboratoire en particulier M^{lle} MAMMASSE Habiba et M^{lle} HASSAINE Samia

Enfin, nous remercions également à travers ce travail, tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

LARAB & BECHROUNE



Dédicace

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail

A tous ceux qui me sont chers :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, mon père que j'adore.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, ma mère à qui je souhaite une longue vie pleine de bonheur et de santé.

A mes très chers frères qui ont été toujours à mes côtés : Naimi, Larbi, Redouan et sa femme Rabiaa.

A mes très chères sœurs qui m'ont toujours encouragé : Haoua, Rjima, Siham et leurs maries (Yacine, Nourddine et Farid).

A ma nièce Imane et mes neveux Ilyane, Houssam et Rayane

A ma binôme Katia

A mes amies : Fadhila, Souad pour leurs aides morales, leurs conseils précieux, et leurs encouragements.

Amel

Dédicace

*J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail
A tous ceux qui me sont chers :*

A

Mes parents Arazki et Yamina qui m'ont tout donné sans rien en retour qui m'ont encouragé soutenu dans les moments les plus difficile. Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et de m'avoir accompagné tout au long de ces années d'études ... J'en suis là aujourd'hui grâce à vous que dieu vous protège

Ma très chère sœur Lina

Mes très chères frères Youba et norddine

Mes oncles et tantes en particulier Karima ,Rachida et ma cousine Loubna

Toute ma famille sans exception

Ma binôme Amel avec qui j'ai passe des moments inoubliable

*Toutes mes amies pour leurs encouragements et leurs soutiens : Fadhila, Hassiba ,
Kenza*

Katia

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

I. Synthèse bibliographique

I.1. Diabète

I.1.2.Définition.....	2
I.1.2.Classification du diabète sucré.....	2
I.1.2.1.Diabète de types 1.....	2
I.1.2.2. Diabète de type 2.....	2
I.1.3. Régulation hormonale de la glycémie	2
I.1.3.1. Action de l'insuline	2
I.1.3.2. Action du glucagon	3
I.1.4. Traitements pharmaceutiques du diabète	3
I.1.5. Cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement du diabète.....	3
I.1.5.1. Glucagon-like peptide-1(GLP1) et la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4).....	5
I.1.5.2.Enzymes de digestion « α -glucosidase et l' α -amylase »	5
I.1.5.3.Récepteur membranaire spécifique des cellules bêta ou SUR1.....	6
I.6. Plantes à effet anti-amylase et anti-glucosidase potentiellement anti- diabétiques.....	7

I.2. Maladie d'Alzheimer

I.2.1. Définition	9
I.2.2. Formes de la maladie d'alzheimer	9
I.2.3 Lésions neuropathologiques caractéristiques de la maladie	10
I.2.3.1 Plaques séniles « plaques amyloïdes ».....	10
I.2.3.2. Dégénérescences neurofibrillaires.....	11
I.2.3.3. Conséquences cellulaires et histologique	11
I.2.4. Atteinte de système de neurotransmetteur « système cholinergiques ».....	12
I.2.5. Cibles thérapeutiques actuelles de l'Alzheimer	12
I.2.5.1. Acétylcholinestérase cible de traitement.....	13
I.2.5.2. Récepteur de glutamate (NMDA) cible de traitement.....	13

I.2.6. Cibles thérapeutique potentielles de l'Alzheimer.....	14
I.2.6.1. Peptide AB amyloïde	14
I.2.6.2. Protéines Tau	15

Partie pratique

II. Matériels et méthodes

II.1. Matrice végétal à tester.....	17
II.2. Obtention des extraits organiques de plante à tester et dosage des flavonoïdes.....	18
II.2.1. Extraction par macération à l'éthanol	18
II.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	18
II.3. Extraction des enzymes et dosage des protéines	19
II.3.1.Extraction de l'amylase de l'orge germée et estimation de l'activité enzymatique...19	
II.3.1.1.Préparation de la poudre végétale de l'orge germée.....	19
II.3.1.2.Extraction de l'amylase de l'orge.....	19
II.3.2. Extraction de α -amylase à partir de comprimés de Médamylase.....	20
II.3.3. Extraction de l'acétylcholine estérase à partir du ver de terre.....	20
II.3.4.Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques	21
II.4.Evaluation des activités enzymatiques amyliques	21
II.4.1.Evaluation des activités amyliques par test qualitatif.....	21
II.4.1.1.Principe du test d'évaluation	21
II.4.1.2. Activité enzymatique de l'amylase de l'orge.....	22
II.4.1.2.1.Mise en évidence de l'activité de l'extrait enzymatique de l'orge	22
II.4.1.2.2.Effet de la température	22
II.4.1.2.3.Effet du pH.....	22
II.4.1.3.Activité enzymatique de l'amylase du Médamylase.....	22
II.4.2. Mesure de l'activité amyliques par test quantitatif.....	23
II.4.2.1.Principe de dosage du glucose par DNS	23
II.4.2.2.Mesure des activités amyliques spécifiques.....	23
II.5. Mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase.....	24
II.6. Etude de l'effet des extraits éthanoliques de plantes sur les activités enzymatiques.....	25

II.6.1.Effet sur la cinétique de l'amylase de Mégamylase.....	25
II.6.2.Effet sur la cinétique de l'amylase de l'orge.....	25
II.6.3.Effet des extraits de plantes sur l'activité de l'acétylcholinestérase	25

III. Résultats et discussion

III.1 Rendement d'extraction	26
III.2 .Teneur en flavonoïdes.....	27
III.3.Taux des protéines et activité enzymatique des extraits d'amylase et d'acétylcholinestérase.....	28
III.4. Température et pH optimum estimés des amylases extraites	28
III.4.1.Température optimale de l'activité des amylases	28
III.4.2. pH optimum estimé de l'activité des amylases.....	31
III.5. Activité anti enzymatique des extraits des plantes	32
III.5.1. Activité anti-amylase	33
III.5.2.Activité anti-acétylcholinestérase.....	35

Conclusion.....37

Références bibliographiques

Annexe

Liste des abréviations

- **ACh** : Aacétylcholine
- **AChE** : Aacétylcholinestérase
- **AMPc** : Adenosine Monophosphate Cyclique
- **APP** : Amyloïd Precursor Protein
- **A β** :peptide Amyloïde- β
- **BSA** : Bovin Sérum Albumine
- **DMSO** :Dimethyl sulfoxide
- **DNF** : Dégénérescences Neurofibrillaires
- **DNS** : Dinitro-salicylique.
- **DO** :Densité Optique
- **DPP4** :Dipeptidyl Peptidase-4
- **DTNB** : 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoate
- **Eq Q**: Equivalent de Quercétine
- **GLP1** : Glucagon-Like Peptide-1
- **IATC** : Iodure d'acétylthiocholine
- **KATP** :Canal potassique dépendant de l'ATP
- **MA** :Maladie d'Alzheimer
- **MAP** : Protéines Associées aux Microtubules
- **MS**: Matière Sèche
- **NMDA** : N-Methyl-D-Aspartate
- **PBS** : Tampon phosphate Salin
- **PHF** : Paired Helical Filaments (paires de filaments appariés en hélice)
- **PKA** :Protéine Kinase A
- **PS1** : Préséniline 1
- **PS2** : Préséniline 2
- **SNC** : Système Nerveux Central
- **SUR1** :Sulfonyl Urea Receptor1
- **TNB** :Thio- 2- N nitro-Benzoate

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Représentation schématique du mécanisme d'action des sulfonylurées antidia-bétiques par liaison au récepteur SURI de la cellule β dans le diabète de type 2	6
2	Schéma représentatif des lésions cérébral	10
3	Cerveaux de patients prélevés à l'autopsie	12
4	Photographie des 7 genre de plantes : (A) <i>Pistachier</i> , (B) <i>Arbutus</i> , (C) <i>Ceratonia</i> , (D) <i>Crataegus</i> ,(E) <i>Olea 1</i> ,(F) <i>Quercus</i> ,(G) <i>Olea 2</i>	17
5	Photographie des 3 genre de plantes : (H) <i>Daphné</i> , (I) <i>Ecballium</i> , (J) <i>Tamus</i>	17
6	Photographie d'orge germée	20
7	Résultats de la coloration au lugol des solutions d'amidon en présence de l'extrait de l'orge après incubation à 50 °C pendant 60 minutes	29
8	Coloration au lugol des solutions d'amidon en présence de l'extrait de Mégamylase après incubation à 37 °C pendant 60 minutes	30
9	Variation de couleur des solutions d'amidon colorées au lugol après 10 min de réaction catalysée par l'amylase de l'orge à différents pH	31
10	Variation de couleur des solutions d'amidon colorées au lugol après 20 min de réaction catalysée par l'amylase du comprimé de Mégamylase à différents pH	32
11	Cinétique de l'acétylcholinestérase en absence et en présence de 1mg/ml des extraits éthanoliques de feuilles de différentes plantes de la région de Kabylie	35
12	Cinétique de l'acétylcholinestérase en absence et en présence de 1mg/ml des extrait éthanoliques de différentes parties des plantes <i>Ecballium</i> , <i>Daphné</i> et <i>Tamus</i>	36

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
I	Quelques médicaments anti diabétique actuellement commercialisés	4
II	Quelques exemples de plantes ayant un effet inhibiteur sur les enzymes de la digestion « amylase, lipase et glucosidase	8
III	Quelques exemples de plantes à activité anti-acétylcholinestérase	16
IV(a)	Taux d'extraction obtenue avec des extraits éthanolique des feuilles des plantes suivantes : <i>Pistachier, Ceratonia, Arbutus, Crataegus, Quercus, Oleal et Oleal</i>	26
IV(b)	Taux d'extraction obtenue avec les extraits éthanolique des différentes parties des plantes <i>Daphné, Ecballium et Tamus</i>	26
V(a)	Taux de flavonoïdes dans les extraits éthanolique des feuilles de plantes suivantes : <i>Pistachier, Ceratonia, Arbutus, Crataegus, Quercus, Oleal et Oleal</i>	27
V(b)	Taux de flavonoides dans les extraits éthanolique des différentes parties des plantes <i>Daphné, Ecballium et Tamus</i>	27
VI	Taux de protéines totales, activités enzymatiques totales et activités spécifiques des extraits enzymatiques	28
VII	Influence de la température sur l'amylase de l'orge	29
VIII	Influence de la température sur l'amylase de Mégamylase	30
IX	Influence de pH sur l'amylase de l'orge à température optimale	31
X	Influence de pH sur l'amylase de Mégamylase à température optimale	32
XI(a)	Taux d'inhibition de l'activité de l'amylase « Mégamylase » par les extraits de différentes parties des plantes : <i>Daphne Thamus, Ecbaliume</i>	33
XI(b)	Taux d'inhibition de l'activité de l'amylase « Mégamylase » par les extraits de feuilles de différentes plantes testées	33
XII(a)	Taux d'inhibition de l'activité de l'amylase de l'orge par les extraits de différentes parties des plantes : (<i>Daphné, Tammus, Ecballium</i>)	34
XII(b)	Taux d'inhibition de l'activité de l'amylase de l'orge par les extraits de feuilles de différentes plantes testées	34
XV	Taux d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits éthanoïque de plantes	36

Introduction

Introduction

De nos jours, le traitement par les plantes ou phytothérapie est reconnu pour sa facilité d'utilisation, son efficacité et son coût bas. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2003), environ 65-80% de la population mondiale à recours au médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (**Guang et al, 1997**). La phytothérapie est actuellement un domaine de recherche et développement en plein essor. La recherche et l'identification des molécules bioactives d'origine végétale est l'un des axes de recherche de l'industrie pharmaceutique qui a tendance à se développer de plus en plus pour pallier à l'utilisation de substances synthétisées chimiquement qui ont, en général, des effets indésirables et dans certain cas présentent une efficacité insuffisante. Les plantes médicinales qui renferment de nombreux principes actifs où certains sont issus du métabolisme secondaire (**Ameenah, 2006**) constituent donc un réservoir d'agents thérapeutiques potentiels qui seront utilisés directement comme principes actifs des médicaments, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments plus efficaces.

Les substances bioactifs végétales s'intègrent beaucoup mieux dans les processus de régulation physiologique de l'organisme humain. Elles constituent l'outil thérapeutique le mieux adapté pour une approche intégrative et régulatrice, de soutien de l'organisme dans sa réactivité adaptative principalement dans les désordres pathologiques dus aux déséquilibres métaboliques comme le diabète, hypercholestérolémie, Alzheimer ...(**Duraffourd et al., 2002**)

L'objectif de notre travaille s'intègre dans un axe de recherche globale de valorisation des substances végétales dans les domaines pharmacologique et thérapeutique. Il consiste à identifier des plantes à activités potentielles antidiabétique et /ou anti-Alzheimer en utilisant des essais sur des enzymes cibles thérapeutiques de ces deux pathologies, en l'occurrence, l'amylase pour le diabète et l'acétylcholinestérase pour le traitement d'Alzheimer.

Pour réaliser ce travail, notre étude expérimentale comporte:

- ✓ L'extraction des principes potentiellement actifs par macération à l'éthanol à partir, principalement, des feuilles de plusieurs matrices végétales.
- ✓ La quantification des flavonoïdes dans ces extraits obtenus.
- ✓ L'évaluation de l'activité anti-amylase et anti-acétylcholinestérase des extraits obtenus.

Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I.1. Diabète

I.1.1. Définition

Le diabète sucré est une affection métabolique, caractérisée par une hyperglycémie chronique (taux de sucre dans le sang trop élevé appelé glycémie) résultant d'un défaut de la sécrétion de l'insuline ou de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (**Drouind et al ,1999**).

I.1.2. Classification du diabète sucré

I.1.2.1. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 « insulino-dépendant » affecte un nombre croissant de personnes dans le monde. Cette pathologie causée par la destruction sélective des cellules β pancréatique par le système immunitaire (**Vieira et al., 2013**). Par conséquent ces patients doivent recevoir des injections quotidiennes d'insuline pendant toute leur vie (**Thorel et Herrera, 2010**).

I.1.2.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 « non insulino-dépendant » est la forme la plus fréquente du diabète. Cette maladie se manifeste lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas efficacement l'insuline qui est produite, Il peut se manifester chez les enfants et les adolescents, mais il apparaît habituellement après l'âge de 30 ans et devient plus fréquent aux âges plus avancés (**Millar et Young, 2003**) .

I.1.3. Régulation hormonale de la glycémie

La glycémie est sous le contrôle de plusieurs hormones mais est réglée essentiellement par l'insuline et le glucagon, deux hormones sécrétées par le pancréas.

1.1.3.1. Action de l'insuline

L'insuline est libérée par les cellules β du pancréas, et elle est la seule hormone hypoglycémisante. Elle réduit le taux de glucose sanguin soit par accélération de sa conversion en glycogène, par la voie de la glycogénogenèse, ou en acide gras, par la voie de la lipogenèse. Elle permet aussi la diminution de la glycogénolyse et de la lipolyse. Une

hyperglycémie détectée par les cellules β gluco-réceptrices déclenche une libération d'insuline qui tend à corriger les écarts du taux de glucose sanguin, avec le retour à la valeur moyen normale.

I.1.3.2. Action du glucagon

Le glucagon est libéré par les cellules α du pancréas et elle est la principale hormone hyperglycémian. Lors d'un besoin de glucose, ou hypoglycémie, cette hormone, antagoniste de l'insuline, agit sur les cellules hépatiques et adipeuses. Elle favorise la glycogénolyse et la néoglucogénèse en stimulant la lipolyse, c'est-à-dire la libération de glycérol qui pourra être utilisé par le foie. La libération du glucagon est déclenchée par la détection d'un signale d'écart de glycémie (baisse de glycémie) par les cellules α du pancréas qui sont à la fois des cellules endocrines et des cellules gluco-réceptrices (**Orsini et al, 2006**).

I.1.4. Traitements pharmaceutiques du diabète

Le traitement du diabète (type 1 ou 2) repose principalement sur l'alimentation, l'exercice physique et les traitements médicaux : médicaments par voie orale ou injectable (insuline). Il est mis à la disposition du diabétique un grand nombre de médicaments dont les principes actifs agissent par différents mécanismes pour réguler la glycémie (**Tableau 1**). Par exemple; la stimulation de la sécrétion de l'insuline, le ralentissement de la digestion des sucres « carbohydrates » ou encore l'inhibition de l'absorption intestinal du glucose alimentaire. (**Tielmans et al , 2007.,Grimaldi et al ,2009., Charbonnel, 2010**).

I.1.5. Cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement du diabète

La thérapie du diabète consiste principalement à stimuler la sécrétion de l'insuline, diminuer la production hépatique du glucose et/ou réduire la résorption intestinale des hydrates de carbones (**Romli,2016**). L'activité biologique des médicaments antidiabétique résulte de leur interaction avec des macromolécules cibles qui déclenche une cascade d'évènements qui aboutira à l'effet pharmacologique. Différents cibles d'action des antidiabétiques sont donc potentielles parmi les quelles : Glucagon-like peptide-1 (GLP1) et la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4), les enzymes de digestion des carbohydrates, le récepteur membranaire spécifique des cellules bêta (SUR1) et autres .

Tableau 1 : Quelques médicaments anti diabétique actuellement commercialisés (Grimaldi et al ,2009 ; Charbonnel 2010 ;Tielmans et al , 2007)

Famille du médicament	Nom générique (nom commerciale)	Mode d'action
Biguanides	Metformine (glucophage®) Metformine à libération prolongée (glumetza®)	Diminution de la production hépatique de glucose
Sulfamides hypoglycémiants	Gliclazide (diamicron®) Gliclazide (diamicron® mr) Glimépiride (amaryl®) Glyburide (diaβeta®)	Stimulation de la sécrétion résiduelle d'insuline par un mécanisme bien identifié en se liant à un récepteur des sulfamide sur la cellule β.
Inhibiteurs des α glucosidases	Acarbose (glucobay®)	Ralentissement de la digestion des glucides dans l'intestin. Le glucose passe plus lentement dans le sang.
Glitazones ou thiazolinediones	Pioglitazone (actos®) Rosiglitazone (avandia®)	Amélioration de la sensibilité à l'insuline, au niveau du foie, du muscle et du tissu adipeux.
Gliptines (inhibiteur de dpp iv)	Sitagliptine (januvia) Vilagliptine (galvus)	Augmentation du taux du GLP1 en bloquant sa dégradation
Agoniste du glp 1	Exénatide (byetta®) exénatide à libération prolongée (bydureon®)	Potentialisation de l'insulinosécrétion provoqué par l'hyperglycémie et freinage de la sécrétion de glucagon

	Liraglutide (victoza®) Dulaglutide (trulicity®)	
Insuline	Glargine (lantus®) Aspart (novorapid®)	Freinage de la production hépatique du glucose.

I.1.5.1. Glucagon-like peptide-1 (GLP1) et la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4)

La GLP-1 (glucagon-like peptide-1) est un peptide de 37 acides aminés, sécrété par les cellules L du jéjunum et de l'iléon. L'ingestion d'un repas, riche en glucides et acides gras, est le premier stimulus physiologique de la sécrétion de GLP-1. Ce peptide est sécrété dans le liquide interstitiel puis déversé dans la circulation, où il est très rapidement métabolisé par une enzyme qui est la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) et son action est donc très brève

La DPP-4 est une enzyme relativement ubiquitaire et peu spécifique elle est largement exprimée de manière ubiquitaire dans la moelle osseuse, la bordure en brosse des entérocytes et l'endothélium vasculaire. C'est une glycoprotéine qui clive la partie N-terminal du GLP-1 en métabolite inactif (**Virally et al, 2008**).

La liaison du GLP-1 à son récepteur (GLP-1R) couplé à une protéine G localise sur la membrane plasmique des cellules beta-pancréatiques stimule les adénylates cyclases et donc la production de 3',5'-adenosine monophosphate cyclique (AMPC). Cette dernière active des voies de signalisation dépendantes de la protéine kinase A (PKA) qui va induire la libération d'insuline (**Thorens, 1992 ., Holz, 2004**).

La pharmacologie, sur ces bases physiologiques, a développé des analogues agonistes du GLP-1 résistants à la DPP4 comme l'Exénatide (Bydureon®) (**Grimaldi et al ,2009**) et des inhibiteurs de la DPP4 comme les gliptines : Sitagliptine (JANUVIA®) (**Bril et al, 2013**).

I.1.5.2. Enzymes de digestion « α -glucosidase et α -amylase »

L' α glucosidase est une enzyme libérée par les entérocytes de la bordure en brosse de l'intestin grêle (**Rabasa-Lhoret et Chiasson ,2000**), par contre les amylases sont synthétisées par le pancréas et les glandes salivaires (**Beaudeau et Durand, 2008**). Ces

enzymes catalysent l'hydrolyse des oligo- et polysaccharides « glucides alimentaires » non absorbables en monosaccharides absorbables au niveau de l'intestin.

Des chercheurs ont développé des inhibiteurs de ces enzymes dans le but de ralentir l'absorption des glucides dans l'intestin donc le glucose passe plus lentement dans le sang, réduisant ainsi l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie postprandiale (**Rabasa-Lhoret et Chiasson, 2000**). La phaséolamine est un inhibiteur de l'activité alpha amylase (**Marshall et Lauda, 1975**., **Layer et al, 1987**), alors que l'acarbose (Glucor[®]) est un exemple d'inhibiteur de l'alpha-glucosidase (**Rabasa-Lhoret et Chiasson, 2000**)

I.1.5.3. Récepteur membranaire spécifique des cellules bêta ou SUR1

Le sulfonyle urea receptor « SUR1 » est un récepteur spécifique présent sur la membrane des cellules bêta des îlots de Langerhans pancréatiques. Ce récepteur est associé au canal potassique dépendant de l'ATP (KATP (KIR6.2)), la liaison d'un ligand comme les sulfamides à ce récepteur entraîne la fermeture du canal potassique dépendant de l'ATP de la cellule bêta qui va permettre la dépolarisation de la membrane et l'ouverture des canaux calciques. L'entrée de calcium dans le cytoplasme des cellules bêta-pancréatiques induit l'exocytose des vésicules qui contiennent de l'insuline. (**Figure 1**). (**Groop et DeFronzo, 1998, Tielmans et al, 2007**).

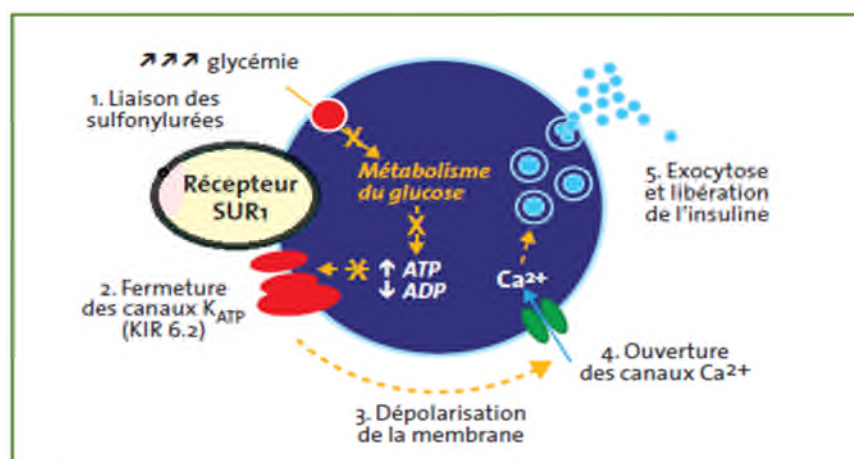


Figure 1: Représentation schématique du mécanisme d'action des sulfonyleurées anti-diabétiques par liaison au récepteur SUR1 de la cellule β dans le diabète de type 2 (**Sherifali et al 2010**).

I.6. Plantes à effet anti-amylase et anti-glucosidase potentiellement anti-diabétiques.

Pour pallier, les effets secondaires associés aux médicaments antidiabétiques synthétiques, l'investigation de substances actives naturelles d'origine végétale est actuellement en plein essor de développement. Les mécanismes d'actions de ces métabolites peuvent être divers et dépendent du type de cible d'action. Ainsi de nombreux laboratoires recherchent des molécules dont le mode d'action serait la diminution de l'assimilation du glucose alimentaire par l'organisme soit par inhibition des enzymes de dégradation des sucres complexes ou par inhibition de l'absorption des oses simples formés. Dans le tableau suivant (**Tableau 2**), sont cités quelques exemples de ces plantes à effet anti-enzyme de digestion.

Tableau I: Quelques exemples de plantes ayant un effet inhibiteur sur les enzymes de la digestion « amylase, lipase et glucosidase »

Nom de la plante	partie de plante	Nature de l'extrait	Enzyme cible	Effet	Observation	Réf.
<i>Lepisanthes alata</i>	Feuilles	Extrait aqueux	α -amylase	IC ₅₀ = 0,77±0,09 µg/mL	Prévention de l'hyperglycémie post-prandiale.	Zhang et al(2016)
			α -glucosidase	IC ₅₀ = 0,83 ± 0,67µg/mL		
<i>Nelumbo nucifera</i>	Feuilles	Extrait éthanolique	α -amylase	IC ₅₀ 2,20 ± 0,18mg/ml	Flavonoïdes des feuilles améliorent efficacement l'hyperlipidémie en inhibant les enzymes clés liées au diabète sucré de type 2. nouvelles sources pharmacologiques pour le traitement de l'hyperlipidémie, l'hyperglycémie et l'obésité	Liu et al (2013)
			α -glucosidase	IC ₅₀ 1,86 ± 0,018mg/ml		
			lipase pancréatique	IC ₅₀ 0,38 ± 0,022mg/ml		
<i>Amaranthus spinosus</i>	Feuilles	Extrait méthanolique	α -amylase	IC ₅₀ =46,02 µg / ml.	Des activités alpha-amylase, antidiabétiques et antioxydants.	Kumar et al (2011)
<i>Tribulus terrestris chickpea</i>	Feuilles	Extraction a l'eau	α -glucosidase	IC ₅₀ 6967 ± 343 et 2885 ± 85,4 µg / ml	Echantillons alimentaires sont des inhibiteurs puissants des enzymes clés dans la digestion des glucides et des lipides in vitro.	Ercan,et Nehir El (2016)
			α -amylase	IC ₅₀ 343 ± 26,2 et 167 ± 6,12 µg / ml		
			Lipas	IC ₅₀ = 15,3 ± 2,03 et de 9,74 ± 1,09 µg /ml		

I.2. Maladie d'Alzheimer

I.2.1. Définition

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neuro-dégénérative progressive et irréversible du système nerveux centrale. Elle va détruire petit à petit les neurones de l'hippocampe qui gèrent la mémoire, puis ceux qui sont impliqués dans toutes les autres fonctions cognitives (le langage, l'émotion, le raisonnement, l'intelligence...) (**Delacourte, 2005**). Cette pathologie dont l'étiologie n'est toujours pas connue, est caractérisée par des lésions histopathologiques bien précises qui sont les plaques séniles (dus à l'accumulation du peptide β -amyloïde) et les dégénérescences neurofibrillaires (dus à l'hyperphosphorylation de la protéine tau) et qui sont associées à une perte neuronale avec atrophie corticale. Ces lésions touchent principalement les voies cholinergiques ce qui va entraîner une diminution de l'acétylcholine. Ce dernier est un neurotransmetteur qui joue un rôle important dans le système nerveux central, où il est impliqué dans la mémoire et l'apprentissage. La MA survient tardivement dans la vie, à l'exception de rares cas d'apparition précoce dus à la présence de mutations génétiques familiales. (**Derouesné et Selmés, 2005**)

I.2.2. Formes de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus fréquente affectant 1 % de la population générale âgée de plus de 65 ans, et de 30 à 50 % des sujets après 80 ans. Il existe deux formes distinctes de cette maladie (**Foubert-Samier, Goize 2010**).

- **La Forme sporadique (forme tardive)** : C'est la forme la plus courante de la maladie d'Alzheimer elle représente environ 99% de tous les cas. Elle est considérée comme une maladie multifactorielle où de nombreux facteurs de risque s'additionnent (l'âge, maladies cardio-vasculaires, le syndrome de Down...ect). Cette forme de maladie se déclare habituellement après l'âge de 65 ans. Dans ce cas la maladie n'est associée à aucune mutation connue (**Iqbal et Grundke-Iqbal, 2010**).

- **La Forme familiale (forme précoce)** : Est une forme d'origine génétique d'apparition plus précoce (avant l'âge de 60 ans). Ces formes particulièrement sévères (appelées formes héréditaires à transmission autosomique dominante) restent rares et

représentent environ 1% des cas. Elles sont dues à des mutations identifiées sur le gène de l'APP (qui code la protéine dont est issu l'Amyloïde β) et sur les gènes PS1 et PS2 (qui codent les enzymes nécessaires à la production de l'Amyloïde β) (**Foubert-Samier, Goize 2010**).

I.2.3. Lésions neuropathologiques caractéristiques de la maladie

La nature neurodégénérative de la maladie d'Alzheimer se traduit par des lésions histopathologiques bien précises qui sont les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires (**Figure 3**) qui sont associées à une perte neuronale avec atrophie corticale (**Govaerts et al, 2007**).

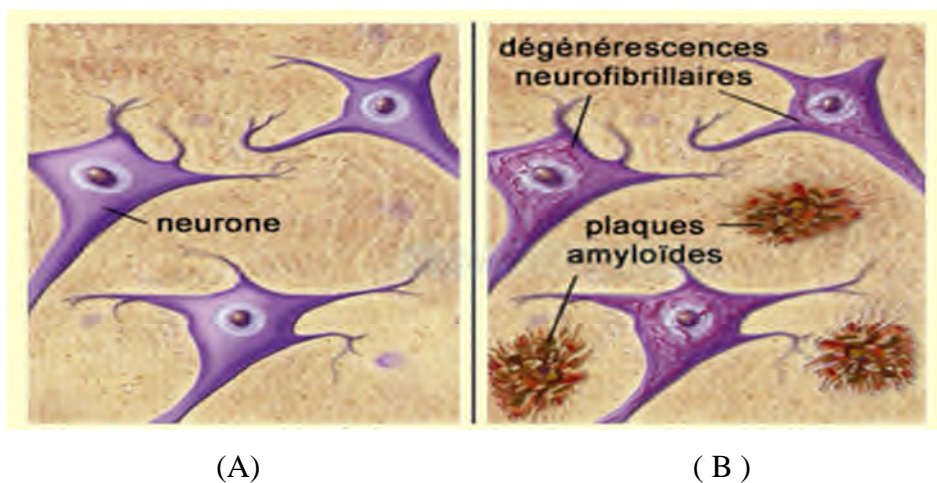


Figure 2: Schéma représentatif des lésions cérébrales (**Anonyme , 2015**)

(A): neurones dans un cerveau normal (B) : neurones dans le cerveau atteint d'une MA.

II.2.3.1. Plaques séniles « plaques amyloïdes »

Ce sont des dépôts extracellulaires sphériques et compacts d'un diamètre compris entre 15 et 200 μm , contenant des noyaux protéiques denses (substances amyloïdes) en son centre et d'une couronne de prolongements nerveux chargés en protéines tau (Unité d'association de la Tubuline) (**Touchon et portet, 2004**). Ces dépôts sont dus à l'accumulation d'un fragment peptidique insoluble et toxique appelé peptide amyloïde- β ($A\beta$) de 4 KDa dont la taille varie de 39 à 43 acides aminés. Ce peptide provient d'un clivage anormal d'une glycoprotéine membranaire appelée «Amyloïd Precursor Protein» (ou APP), une protéine transmembranaire très répandue dans l'organisme, jouant plusieurs rôles dans différents types de cellules et dans le système nerveux central (SNC). Le peptide $A\beta$ de nature hydrophobe a une action neurotoxique en s'agréant dans la plaque sénile par formation

de fibrille entraînant des réactions inflammatoires provoquant la mort des neurones (Govaerts et al, 2007).

II.3.2.1. Dégénérescences neurofibrillaires

Ce sont des dépôts filamenteux intraneuronaux, constitués de paires de filaments appariés en hélice (PHF : paired helical filaments) dont le constituant principal est la protéine tau (Unité d'association de la Tubuline) anormalement phosphorylée. La protéine tau appartient à la famille des Protéines Associées aux Microtubules (MAP). Elle est soluble et principalement exprimée dans les neurones. La protéine tau soluble assure la stabilité des microtubules (composants essentiels du cytosquelette des neurones) et assure donc une fonction dans l'établissement et le maintien du transport axonal, essentiel à la vie du neurone (Delacourte, 2000). En condition pathologique, la protéine tau perd sa propriété de solubilité, la forme des structures filamenteuses est anormalement phosphorylée. L'hyperphosphorylation de la protéine tau diminue son affinité pour les microtubules, ce qui engendre la dépolymérisation de ces derniers générant ainsi une instabilité microtubulaire puis une dégénérescence neurofibrillaire pouvant entraîner la mort des neurones. (Govaerts et al, 2007).

II.3.2.3. Conséquences cellulaire et histologique

Les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires sont associées à une perte neuronale avec atrophie cortical.

- **La Perte neuronale** : considérée comme un des signes principaux de la maladie d'Alzheimer, est en réalité difficile à quantifier. Elle est liée à la présence des dégénérescences neurofibrillaires. Elle est donc tardive dans les régions où la DNF n'apparaît qu'aux derniers stades de la maladie. Elle est précoce au contraire dans les régions les plus touchées par la DNF comme le cortex entorhinal. Cette perte neuronale se manifeste par une atrophie du cerveau (Dhenain et al, 2002).
- **L'Atrophie corticale** : est une caractéristique macroscopique évidente des patients atteints de la MA (Figure 4). Le poids du cerveau est réduit d'environ 30% et présente un élargissement des ventricules particulièrement dans les régions du langage et de la mémoire. L'atrophie cérébrale est due à une perte synaptique mais aussi et surtout à

une perte neuronale sévère qui concerne particulièrement les neurones corticaux de grande taille et affecte principalement le système cholinergique (**Dhenain et al, 2002**).

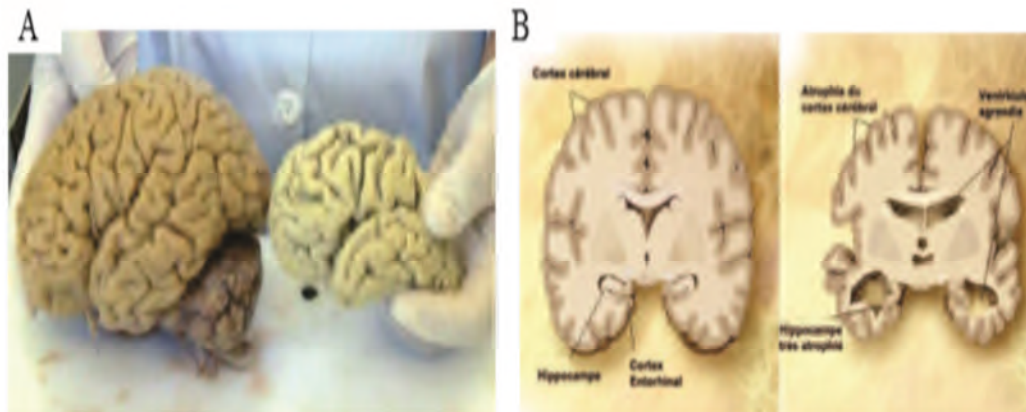


Figure 3: Cerveaux de patients prélevés à l'autopsie (**Anonyme ,2011**).

(A) cerveau d'un patient non touché par une démence (à gauche) et d'un patient atteint d'une MA (à droite). (B) Représentation d'une coupe de cerveau normal (à gauche) et à atrophie cérébrale (à droite)

I.2.4 .Atteinte de système de neurotransmetteur « système cholinergiques »

Au cours de la maladie d'Alzheimer plusieurs voies de transmissions neuronales sont atteintes, notamment au niveau des systèmes de neurotransmission de la voie cholinergique (**Quetu et al, 2009**). Ces neurones cholinergiques sont essentiellement situés au niveau du noyau basal de Meynert , où 90% des neurones sont des neurones cholinergiques . Ils sont aussi situés au niveau de l'hippocampe. Dans la maladie d'Alzheimer, le noyau de Meynert perd jusqu'à 70 à 80% de ses neurones. (**Leuba et al, 2013**). Dans la majorité des études sur ce sujet, il a été remarqué que l'activité de l'acétylcholine-transférase (l'enzyme de la synthèse de l'acétylcholine) était diminuée au niveau du cortex et de l'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport aux patients sains (**Contestabile, 2011**) .

I.2.5. Cibles thérapeutique actuelles de l'Alzheimer

Les traitements spécifiques prescrits à ce jour dans le cadre de la maladie d'Alzheimer sont des traitements symptomatiques qui ciblent directement l'acétylcholinestérase et le récepteur de glutamate (NMDA).

I.2.5.1. Acétylcholinestérase cible de traitement

L'acétylcholinestérase (AChE) : une protéine exprimée dans le système nerveux et sanguin des eucaryotes appartient à une famille d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine (ACh) en choline et en acide acétique, située principalement dans la fente synaptique. Le principal rôle biologique de l'acétylcholinestérase est la régulation de la transmission de l'influx nerveux en assurant l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques centrales et périphériques, a fin de permettre aux neurones cholinergiques de revenir à l'état de repos après leur activation par des influx nerveux (**Anglais et Webster , 2012**).

Chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, la concentration d'acétylcholine est diminuée, ce qui explique les troubles cognitifs observés. L'acétylcholine est un neurotransmetteur qui joue un rôle important dans le système nerveux central, où elle est impliquée dans la mémoire et l'apprentissage. La solution pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste alors à diminuer sa dégradation, ceci en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase (**Nourhashémi, 2006**) .

Il existe aujourd'hui, sur le marché, trois médicaments différents qui inhibent l'acétylcholinestérase avec la même efficacité indiqué: le Donépézil (Aricept®), la klmédicaments consiste à bloquer l'action de l'acétylcholinestérase afin de limiter la diminution de la concentration d'acétylcholine au niveau cérébral et donc d'améliorer les fonctions cérébrales chez les patients (**Grossberg, 2003**).

I.2.5.2. Récepteur de glutamate (NMDA) cible de traitement

Le glutamate est un neurotransmetteur exciteur du SNC qui possède un rôle dans la transmission et la plasticité synaptique. Son effet est assuré via son interaction à l'un des 3 types de récepteurs spécifiques connus dont les récepteurs NMDA (N-Methyl-D-Aspartate). L'activation de ces récepteurs provoque un influx de calcium dans les neurones pendant une longue période : c'est un phénomène qui est impliqué dans la potentialisation à long terme (phénomène qui intervient lui-même dans les fonctions de mémoire et d'apprentissage). (**Bliss et Collingridge, 1993**)

Dans la MA, il y a une forte augmentation de glutamate au niveau extracellulaire, ce qui provoque une activation excessive des récepteurs NMDA et donc une accumulation intracellulaire de calcium donc une excitotoxicité neuronale . Ce processus est à l'origine

de l'initiation d'une cascade d'évènements dont la conséquence est la mort neuronale (**Greenamyre et Young, 1989 ., Greenamyre et Porter, 1994**).

La mémantine est un médicament prescrit dans le traitement des formes modérées à sévères de MA, il protège les neurones de l'excitotoxicité induite par le glutamate. (**Letrilliart et Pouchain, 2011**). La mémantine est un antagoniste non compétitif (bloquant les canaux) du récepteur NMDA, de faible affinité et voltage dépendant. . Ce médicament inhibe l'influx prolongé d'ions Ca^{2+} qui est à la base de l'excitotoxicité neuronale sans altéré les fonctions physiologiques du récepteur NMDA (**Robinson et Keating, 2006**). En effet, en raison de sa faible affinité pour ce récepteur, la cinétique de dissociation de la mémantine du canal de ce récepteur est assez rapide ce qui permet l'activation des récepteurs par des concentrations relativement hautes de glutamate relâché à la suite de la dépolarisation des neurones présynaptiques. La mémantine a un effet positif modeste sur la cognition, l'humeur et le comportement des patients (**Parsons et al, 2007**).

I.2.6. Cibles thérapeutique potentielles de l'Alzheimer

Les nouvelles cibles thérapeutiques médicamenteuse identifiées de la maladie d'Alzheimer actuellement en essais cliniques, permettent de lutter non pas uniquement contre les symptômes mais contre les causes de la maladie. Les traitements d'avenir de la maladie d'Alzheimer s'orientent vers ces nouvelles cibles qualifiées dont le peptide AB amyloïde et la protéine tau.

I.2.6.1. Peptide AB amyloïde

Le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer présente des plaques amyloïdes, dont le constituant majeur est le peptide amyloïde $A\beta$. Celui-ci est produit suite au clivage anormal de protéine précurseur d'amyloïde (APP). Trois types de traitement basés sur l'hypothèse amyloïde sont en développement (**Forette, 2009**) :

- Par modulation des sécrétases $A\beta$ tels les stimulateurs de l' α sécrétase ou les inhibiteurs de la β et γ secretases.
- Par inhibition de l'agrégation fibrillaire de l'amyloïde : la stratégie consiste à diminuer le taux de cuivre et de zinc (l'agrégation de la protéine $A\beta$ est facilitée par le cuivre et le zinc).
- Par élimination du peptide $A\beta$: La vaccination est une solution proposée pour l'élimination des agrégats $A\beta$.

I.2.6.1. Protéines Tau

La protéine tau hyperphosphorylée agrégée est le composant protéique principal des dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Les lésions neuropathologique dues au DNF surviennent tôt dans le développement de la maladie. L'hyper phosphorylation de Tau est due soit à une augmentation de l'activité des kinases et/ou une diminution de l'activité des phosphatases. L'inhibition de la dégénérescence neurofibrillaire liée à l'hyperphosphorylation de la protéine tau représentent la voie principale de traitement curatif de la MA. Cela peut être réalisé par l'inhibition des kinases, l'activation des phosphatases ou l'inhibition de l'agrégation de la protéine tau hyperphosphorylée (**Forette, 2009**).

Tableau III. Quelques exemples de plantes à activité anti-acétylcholinestérase

Nom de la plante	Partie de plants	Nature de l'extrait	Efficacité	Observation	Référence
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> <i>Ocimum canum</i>	Feuilles	Huiles essentiels	IC 50 de 18,98 µg / ml & C50 36,16 µg / ml .	Activités antioxydants très faible.	Kiendrebeogo et al , 2011
<i>Hedychium gardnerianum</i>	Feuilles	Huiles essentielles	IC 50 d'environ 1 mg / ml.	Activité attribuée à la présence de sesquiterpènes, qui constituaient plus de 60% de la composition des huiles.	Miguel et al , 2012
<i>Myrtus communis L</i>	Feuilles	Extrait méthanolique	Taux d'inhibition de 91,2%	Inhibition d'activité enzymatique de la LOX (94,5%).	Seema et al , 2012
<i>Pistacia atlantica</i>	Feuilles	Extrait aqueux	IC 50 de 58,05 ± 0,12 µg / ml.	Une activité anti-inflammatoire, Antifongique, antimicrobien, antiviral, anti-insecte, ant, hypoglycémique et anticancéreux .	Peksel et al , 2013
<i>Myrtus communis</i> <i>Pistacia lentiscus</i> <i>Eryngium maritimum</i>	Feuilles	Extrait méthanolique	Taux d'inhibition de 92,38, 73,84 et 65,34%, r	Les feuilles, la tige un bon pouvoir meilleur pouvoir chélatant,	Amessis-ouchemoukh et al , 2014
<i>Elatostema papillosum</i>	Feuilles	Extrait méthanolique	CI50 de 165,40 ± 4,01mg/ml	Riche en composés phénoliques (23,74 mg / g d'extrait sec) et en flavonoïdes (31,18 mg / g extrait sec)	Reza et al , 2018
<i>Rhinacanthus nasutus</i>	Feuilles	Extrait méthanolique	Taux d'inhibition 23,45 % à une 100 µg / ml. ,	Traitement traditionnel de l'infection bactérienne, et le diabète et l'hypertension .	Boonyaketgoston et al ,2018

Matériels et méthodes

II.MATERIEL ET METHODES

II.1. Matrice végétale à tester

Pour cette étude différentes matrices végétales ont été utilisées pour tester leurs effets anti-enzymatiques:

- Les Feuilles de 7 genre plantes : *Pistachier* (FP), *Arbutus* (FA), *Ceratonia* (FCe), *Crataegus* (FCr), *Olea 1* (FO1), *Quercus* (FQ), *Olea 2* (FO2) (**Figure 4:** A,B, C,D ,E ,F et G) (**Mezahem , 2015**)
- Les racines, tiges, fruits, feuilles, et graines de 3 genres de plantes: *Daphné* (RD et TD), *Ecballium*, (FrE, FeE et RE), *Tamus* (GTet TT) (**Figure 6 : H , I et J**)

Les feuilles de *Pistachier*, *Arbutus*, *Ceratonia*, *Crataegus*, *Olea 1*, *Quercus*, *Olea 2*, ont été récolté dans différentes régions de la wilaya de Bejaïa au cours de l'année 2014, nettoyées, séchées à 40°C et réduites en poudres fines homogène stockées dans des récipients en verre, hermétiquement fermés à l'abri de la lumière et de l'humidité .

Les parties aériennes et racine de *Daphné*, *Ecballium*, *Tamus* ont été récolté durant la période de floraison et fructification dans la région de Tazmalt au cours du dernier trimestre de 2017 et premier trimestre de l'année 2018. Les différentes parties de ces plantes « fruits, feuilles, racine et tiges » ont été séparées, séchées à 40°C et réduites en poudres fines conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité dans des flacons hermétiquement clos jusqu'à utilisation.



Figure 4 : photographie des 7 genre de plantes : (A)*Pistachier* , (B)*Arbutus* , (C)*Ceratonia*, (D)*Crataegus* ,(E) *Olea 1*,(F) *Quercus*,(G) *Olea 2* .



Figure5 : photographie des 3 genre de plantes : (H) *Daphné* , (I) *Ecballium*, (J) *Tamus*

II.2. Obtention des extraits organiques de plante à tester et dosage des flavonoïdes

II.2.1. Extraction par macération à l'éthanol

L'extraction a été réalisée selon la méthode décrite par **Behammou et al.,(2008)**.

20 g de la poudre végétale a été laissée macérer dans un volume de 100 ml d'éthanol absolue pendant 5 jours. Le macérât a été filtré à l'aide d'un papier wattman. Le filtrat obtenu a été ensuite séché sous hotte chimique pendant dix jours, puis dans l'étuve (40°C) pendant 24 heures jusqu'à évaporation complète de l'éthanol. L'extrait éthanolique récupéré après évaporation a été conservé dans des flacons en verre hermétiquement fermés, bien étiquetés et à l'abri de la lumière.

Calcul du rendement d'extraction

Le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{P_1 - P_0}{P_2} \times 100$$

Avec : P_0 : poids du bécher vide en mg

P_1 : poids du bécher avec l'extrait sec

P_2 : poids de la poudre initial

II.2.2 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par la méthode au chlorure d'aluminium (AlCl_3) citée par **Djeridane et al., (2006)**. Le principe du dosage est basé sur la capacité des flavonoïdes a chélate via leurs groupements hydroxyles (OH) libre l'ion Al^{+3} et former un complexe de couleur jaunâtre (**Quettier et al., 2000**).

- *Mode opératoire*

1ml de chlorure d'aluminium à 2% est ajouté à 1 ml de l'extrait de différentes matrices végétales étudiées solubilisé dans le DMSO à raison de 10 mg/ml. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, les absorbances sont lues à 430 nm contre un blanc contenant 1ml d' AlCl_3 à 2% et 1 ml DMSO.

- *Expression des résultats*

Les taux de flavonoïdes sont exprimés en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe**) établie avec différentes concentrations de quercitrine comme standard réalisés dans les

mêmes conditions opératoires citées ci-dessus. Les taux de flavonoïdes sont exprimés en équivalent mg de quercétine/g de matière sèche.

II.3. Extraction des enzymes et dosage des protéines

Dans notre étude, nous avons utilisé trois sources d'enzymes :

- L'orge germée pour l'amylase végétale
- Un médicament anti-inflammatoire « Médamylase » pour l'alpha amylase salivaire.
- Ver de terre pour l'acétylcholine estérase

II.3.1. Extraction de l'amylase de l'orge germée et estimation de l'activité enzymatique

II.3.1.1. Préparation de la poudre végétale de l'orge germée

Pour extraire l'amylase sous forme active, l'orge (orge de l'importation) doit être au stade de germination. La germination a été réalisée au niveau du laboratoire, on procédant comme suit :

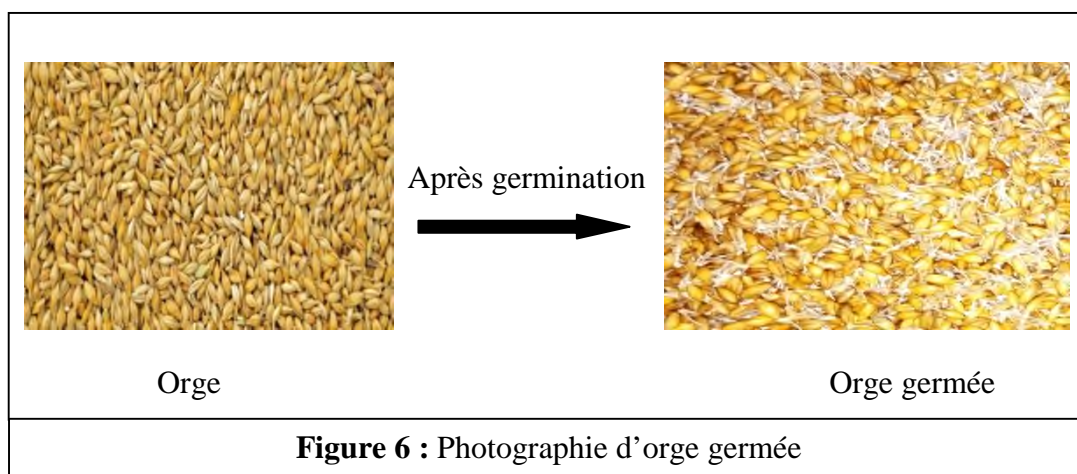
L'orge a été mis dans un seau dans lequel, de l'eau a été versée jusqu'à débordement pour permettre aux saletés et aux débris d'en sortir. L'orge ainsi lavée est ensuite égouttée à l'aide d'un tamis à mailles fines puis étalée en une couche peu épaisse sur un plateau recouvert en papier absorbant. La surface de l'orge ainsi étalée est ensuite recouverte avec du papier trempé d'eau de temps en temps pour maintenir un taux d'humidité nécessaire à la germination. Après 48h à température ambiante, l'orge commence à germer, les radicelles commencent à croître vers l'extérieur (**Figure 6**). A ce stade de germination, les graines d'orge germées sont séchées dans l'étuve à 40 °C pendant 5 jours. Une fois séchées, les graines sont séparées de leur racine par frottement entre les mains, tamisées puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique afin d'obtenir une farine d'orge germé (le malte) (**Smith, 2009**).

II.3.1.2. Extraction de l'amylase de l'orge

L'amylase de l'orge germée a été extraite par l'eau distillée selon un protocole classique (**MacGregor, 1977**).

10 g de malt (farine d'orge germée) sont suspendus dans 100 ml d'eau distillée et mélangé sous agitation magnétique pendant 15 min puis filtré. Le filtrat est ensuite Centrifugé à 4000 rpm à une température 4 C° pendant 20 min. Le surnageant qui contient l'enzyme (amylase) récupéré et rapidement homogénéisé et aliquoté par fractions de 5 à 10ml

conservées à 4°C pour utilisation immédiate ou bien conservées au congélateur à -20°C pour utilisations ultérieures.



II.3.2. Extraction de α -amylase à partir de comprimés de Médamylase

L'extraction a été réalisée à partir de Médamylase, un médicament anti inflammatoire qui contient 3000 unités d' α -amylase par comprimé. Deux comprimés dont l'enrobage a été enlevé à l'aide d'un couteau fin ont été écrasés dans un mortier avec 10 ml d'eau distillée. Le mélange a été ensuite filtré sur papier Wattman. Le filtrat obtenu a été ensuite additionné de 1 ml de chlorure de calcium 0,1 % pour améliorer la solubilité de l'enzyme puis centrifugé à 4000 rpm pendant 10min. Le surnageant récupéré est rapidement homogénéisé et aliquoté par fractions de 1ml conservées à 4°C pour utilisation immédiate ou bien conservées au congélateur à -20°C pour utilisations ultérieures.

II.3.3. Extraction de l'acétylcholinestérase à partir de ver de terre

L'enzyme est extraite à partir des muscles de ver de terre invertébré. Les étapes d'extraction sont réalisées à froid afin d'éviter l'altération de l'enzyme. Quatre Vers de terre ont été placés sur un bac à glace pour les engourdir, dès qu'ils ne bougent pratiquement plus, on coupe la tête et la queue à 1 cm de l'extrémité. En suite on fait une incision médio ventrale tout le long du corps pour l'ouvrir entièrement. Une fois tous les organes internes sont soigneusement supprimés, la paroi du corps est bien rincée à l'eau distillée froide puis broyée dans un mortier avec 25 ml d'eau distillée glacé et ensuite passée dans un homogénéisateur. L'homogénat obtenu est ensuite filtré puis centrifugé à

6000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant qui contient l'enzyme est récupéré, fractionné en aliquotes de 2-5ml et conservé à -20°C jusqu'à utilisation (**Anonyme, 2011**)

II.3.4.Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques

La quantification des protéines dans les trois extraits enzymatiques a été réalisé par dosage colorimétrique selon la méthode de **Bradford ,(1976)**. Ce dosage est basé sur la mesure de la variation d'absorbance à 595 nm correspondant au changement de la couleur du réactif bleu de Coomassie après liaison (complexation) avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines (**Bradford ,1976**).

- **Mode opératoire**

50 µL de l'extrait enzymatique et 50 µL d'eau distillé sont additionnés à 4 ml de réactif de bleu de Coumassie G250. Le mélange est agité, puis mis au repos pendant 10 minutes pour stabiliser le complexe coloré formé puis les absorbances sont lues à 595nm à l'aide d'un spectrophotomètre visible de type RAYLEIGH.

- **Expression des résultats**

Le taux des protéines dans les extraits enzymatiques est exprimé en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe**) établie avec différentes concentrations de BSA de 0 à 100 µg/ml (bovin sérum albumine) comme standard dans les mêmes conditions opératoires.

II.4.Evaluation des activités enzymatiques amylasiques

II.4.1.Evaluation des activités amylasique par test qualitatif.

II.4.1.1.Principe du test d'évaluation

Pour mettre en évidence l'activité des amylases dans les extraits enzymatiques de l'orge germée et de Mégamylase a fin d'explorer et estimer les paramètres physico-chimiques optimums du milieu réactionnel. Le protocole d'évaluation qualitative basé sur l'utilisation du lugol « solution Iodine ». (**Gur et al, 1969**).

A froid, Le lugol, solution aqueuse composée de diiode (1%) et d'iodure de potassium (2%), réagit spécifiquement avec l'amidon en donnant une coloration bleu plus ou moins intense selon la concentration et avec les dextrines une coloration rouge à jaune pâle suivant le nombre d'unités de glucose. (**Dubois et al, 1956**). La coloration de l'amidon par

l'iode résulte de la fixation des molécules de diiode absorbées à l'intérieur des hélice d'amylose à raison d'une molécule pour deux tours d'hélice, chaque tour d'hélice comportant chacun six résidus glucose produisant un complexe coloré dont la couleur dépend de la taille du polyside. La couleur caractéristique bleue à violet nécessite la fixation d'au moins trois molécules de diiode ce qui correspond à un oligosaccharide d'au moins 36 résidus glucose comme c'est le cas de l'amidon (**Thoma et French, 1960**).

II.4.1.2. Activité enzymatique de l'amylase de l'orge

II.4.1.2.1. Mise en évidence de l'activité de l'extrait enzymatique de l'orge

Dans deux tubes à essai de 20ml, on mélange 10 ml d'une solution d'empois d'amidon à 1% avec 1ml d'extrait d'orge (tube essai) ou 1ml de PBS (tube contrôle) et 1ml de PBS. On laisse incuber pendant 60min à température ambiante puis on ajoute 1 goutte de lugol dans chaque tube et on note la disparition ou non de la coloration bleu caractéristique de la présence de l'amidon.

II.4.1.2.2. Effet de la température

On mélange, dans des tubes à essais de 20ml, 10ml d'empois d'amidon (1%) et 1ml d'extrait enzymatique (tube essai) ou 1ml de PBS (tube contrôle) et 1ml de PBS. On mélange rapidement et on récupère de chaque tube 1ml du mélange auquel on ajoute 1goutte de lugol, cette mesure correspond au temps t_0 . On met les autres tubes à incuber au bain marie à différentes températures 25°C, 37°C, 50°C, 60°C et 70°C. Toutes les Cinq minutes d'incubation, on récupère 1ml du mélange auquel on ajoute une goutte de lugol et note la couleur du mélange

II.4.1.2.3. Effet du pH

Pour faire ce teste il faut une solution d'amylase, l'empois d'amidon (1%), l'eau iodée et tampon phosphate salin (PBS) .

Dans des tubes à essais de 20ml, on mélange 5ml d'une solution d'empois d'amidon à 1%, et 6ml de tampon phosphate salin à différent pH (pH4, 5, 6, 7, 8) et 1ml d'extrait enzymatique (essai) ou 1ml de PBS (contrôle). On met à incuber pendant 60 min à 50°C et note l'évolution du changement de couleur de la solution après ajout de lugol toutes les 10 min de réaction.

II.4.1.3. Activité enzymatique de l'amylase du Médamylase

L'ensemble des essais de mise en évidence et de l'estimation de la température optimal et du pH optimum de l'activité de l'enzyme extraite suivent la même procédure que celle utilisée pour l'amylase de l'orge germée avec quelques modifications.

Ainsi pour la mise en évidence de l'activité de l'enzyme dans le surnageant récupéré, l'essai a été réalisé en mélangeant 6,9 ml de tampon phosphate salin a 0,1M, pH7 contenant 0,01 mg/ml de NaCl et 5 ml d'empois d'amidon (1%) et 100µl d'extrait d'enzyme. L'hydrolyse enzymatique de l'amidon a été ensuite suivie à 37°C pendant 60 min en utilisant le test qualitatif au lugol comme précédemment décrit.

Cette étude à été réalisée en utilisant le même protocole et en variant le pH entre 4 et 8 ou la température d'incubation entre 20 et 60°C .

Les résultats seront exprimés par rapport au changement de couleur observée et leur intensité.

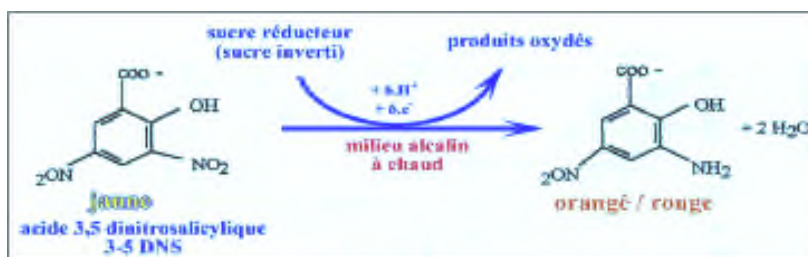
II.4.2. Mesure de l'activité amylasique par test quantitatif

Pour quantifier l'activité de l'amylase dans les extraits de l'orge ou du médicament, le test colorimétrique indirect du dosage du glucose, produit par hydrolyse enzymatique de l'amidon, par le DNS « acide 3,5-dinitrosalicylique » (Sahoré et Abouttier , 2016) est réalisé.

NB. Tous les essais sont réalisés en double

II.4.2.1.Principe de dosage du glucose par DNS

En milieu alcalin et à chaud, les groupements aldéhyde libre du glucose (sucre réducteur) réduisent l'acide 3,5-dinitrosalicylique oxydé de couleur jaune orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique réduit de couleur rouge orange qui absorbe à 540 nm. L'intensité de la coloration rouge-orange est proportionnel à la quantité du sucre réducteur présent dans le milieu réactionnel (Sahoré et Abouttier ,2016)



II.4.2.2.Mesure des activités amylasiques spécifiques

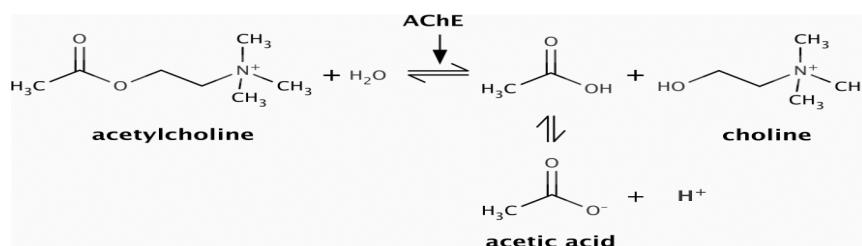
Mélanger dans un volume final de 12ml ; 2 ml de tampon phosphate salin 0,1 M pH5 (pour l'enzyme de l'orge) ou pH7 (pour l'enzyme du Médamylase), 7 ml de solution d'empois d'amidon à 1% et 1ml d'extrait d'orge ou 100µl d'extrait du Mégamylase. Laisser incuber pendant 60 min à 50°C pour l'activité d'amylase de l'orge ou 37°C pour l'activité de l'amylase du médicament.

Au bout de 60 minute de réaction, on récupère 1,5ml de chaque solution auxquelles on ajoute 1ml du réactif DNS et on laisse chauffer à 100°C pendant 5min . On refroidit les solutions par ajout de 7,5 ml d'eau distillée. On mesure la DO à 540nm et en se réfère à une courbe d'étalonnage réalisée avec une gamme de concentration de glucose (**Annexe**) pour déterminer la quantité de glucose produit après 60 min de réaction enzymatique. Les activités enzymatiques seront exprimées en Unité/mg de protéine. (**Xu et al,2007**)

II.5. Mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase

- *Principe du dosage*

L'acétylcholinestérase (AChE) hydrolyse l'Acétylcholine selon la réaction suivante :



Expérimentalement on utilise l'iodure d'acétylcholine (IATC) comme substrat de cet enzyme dont le produit de la réaction est la Thiocholine . L'activité de l'AChE est déterminée suivant la méthode colorimétrique d'**Ellman et al, (1961)** basée sur la réaction de la Thiocholine avec le 5,5'dithio-bis 2-nitrobenzoate (DTNB) qui donne le Thio- 2- N nitro-Benzoate (TNB) un composé jaune qui absorbe à 470 nm. L'absorbance du TNB mesurée à l'aide du spectrophotomètre est proportionnelle à l'activité enzymatique de l'Acétylcholinestérase.

- *Mode opératoire*

On mélange 0.3 ml de tampon phosphate 0,1M a pH=7.5, et 0.15 ml d'IATC 7 mM, 0.4 ml de DTNB 0,23mM et 0.15 ml d'extrait d'acétylcholinestérase . On homogénéise le mélange et on incube pendant 10min à température ambiante puis on mesure

l'absorbances à 470 nm. On réalise un blanc dans les mêmes conditions mais sans enzyme.

II.6. Etude de l'effet des extraits éthanoliques de plantes sur les activités enzymatiques.

II.6.1.Effet sur la cinétique de l'amylase de Médamylase

La cinétique de l'amylase de Médamylase a été suivie pendant 60 minutes à 37°C et à pH 7 en présence et en absence d'une concentration finale de 1 mg/ml d'extrait végétal. Le mélange réactionnel est constitué de 7ml de solution d'amidon 1%, 2ml de tampon phosphate salin 0,1M a pH=7, 1ml de DMSO ou 1ml d'extrait végétale solubilisé préalablement dans du DMSO à raison de 10mg/ml, et 100µl d'extrait de Mégamylase. L'activité est mesurée après 60 min par dosage du glucose formé par le DNS.

II.6.2.Effet sur la cinétique de l'amylase de l'orge

La cinétique de l'amylase de l'orge germée a été suivie pendant 60 minutes à 50°C et à pH 5 en présence et en absence d'une concentration finale de 1 mg/ml d'extrait végétal. Le mélange réactionnel est constitué de 7ml de solution d'amidon 1%, 2ml de tampon phosphate salin 0,1 M a pH=5, 1ml de DMSO ou 1ml d'extrait végétale solubilisé préalablement dans du DMSO à raison de 10mg/ml, et 1ml d'extrait d'orge germé. L'activité est mesurée après 60 min par dosage du glucose formé par le DNS.

II.6.3.Effet des extraits de plantes sur l'activité de l'acétylcholinestérase

Dans une cuve on mélange 0.3 ml de tampon phosphate 0.1M à pH=7.5, 0.1ml d'extrait végétale ou 0.1 ml de DMSO, 0.15 ml d'IATC, 0.4 ml de DTNB et 0.15 ml d'extrait d'acétylcholinestérase et on suit la variation d'absorbance à 470 nm pendant 10 minute. Les résultats sont exprimés par variation de DO/minute.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Rendement d'extraction

Les taux d'extraits brutes obtenus par macération dans l'éthanol des différentes plantes étudiées variées entre 6,81 et 39,3 % (**Tableaux V(a) et V(b)**). Ces extraits sont probablement enrichis en composés bioactifs polaire du fait de la polarité de l'éthanol . D'autre part, l'éthanol est moins altérant et moins toxique que d'autres solvants organiques d'extraction de polarité proche comme le méthanol et l'acétone. Du point de vue pratique, l'éthanol est facile à éliminer (volatile) par simple évaporation (**Ribéreau-Gayon, 1968**). Les résultats montrent que les rendements d'extractions des feuilles des plantes varient entre 13,6 et 39,3 %. Le rendement le plus élevé a été obtenu pour les feuilles de *daphné* (39,3 %) suivi des feuilles d'*Olea*1 et de *Pistachier* (21,88 %, 20,12%), et les feuilles de *Quercus* qui donnent le rendement le moins élevé (13,6%). D'autre part, une différence de rendement a été observée pour les différentes parties de la même plante. Ainsi, pour *Daphné* et *Ecballium*, les feuilles donnent de meilleurs rendements (39,3% et 31,28%) que les tiges (32,5 % & 24,12%) et les racines (22,79% & 24,08%). Les taux d'extractions les plus faibles ont été obtenu pour la tige et la graine de *Tamus* (15,25% & 6,81%). Ces différences en taux d'extraction peuvent être influencées notamment par la composition chimique et les métabolites secondaires des plantes (**Nawaza et al, 2006., Falleh et al, 2008**).

Tableau IV(a): Taux d'extractions éthanoliques obtenus pour les feuilles des plantes suivantes : *Pistachier*, *Ceratonia*, *Arbutus*, *Crataegus*, *Quercus* et *Olea*.

plantes	<i>Pistachier</i> FP	<i>Arbutus</i> FA	<i>Ceratonia</i> FCe	<i>Crataegus</i> FCr	<i>Olea</i> 1 FO1	<i>Quercus</i> FQ	<i>Olea</i> 2 FO2
Rendement (%)	20,12	25,72	13,6	16,4	21,88	13,8	20,16

Tableau IV(b) : Taux d'extraction éthanolique obtenus pour les différentes parties des plantes *Daphné*, *Ecballium* et *Tamus*.

Plantes	<i>Daphné</i>			<i>Tamus</i>		<i>Ecballium</i>			
	Racine RD	tige TD	feuille FD	grain GT	tige TT	tige TE	racine RE	fruit FrE	feuilles FeE
Rendement (%)	22,79	32,5	39,3	6,81	15,25	24,12	24,08	22,99	31,28

Bien que nous avons utilisé une méthode d'extraction non épuisante par macération à froid, les rendements obtenus sont assez suffisants pour l'objectif d'étude que nous avons fixé. Si on veut améliorer ces rendements, il est recommandé de faire appel à des méthodes d'extraction épuisantes comme l'extraction au Soxhlet et l'extraction assistée aux micro-ondes ou aux ultra-sons (Ganzler *et al*, 1986., Luque de Castro et Priego-Capote, 2010).

III.2 Teneur en flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes dans les extraits éthanoliques des différentes plantes étudiées ont été déterminées par méthodes colorimétriques (Ribéreau-Gayon, 1972., Quettier *et al*, 2000). Les taux en flavonoïdes exprimés en mg EqQ/gMS obtenus sont représentés dans les **Tableaux V(a) et V(b)**.

Tableau V(a): Taux de flavonoïdes dans les extraits éthanoliques des feuilles de plantes suivantes : *Pistachier*, *Ceratonia*, *Arbutus*, *Crataegus*, *Quercus*, *Olea*,

Plantes	<i>Pistachier</i> FP	<i>Arbutus</i> FA	<i>Ceratonia</i> FCe	<i>Crataegus</i> FCr	<i>Olea</i> I FO1	<i>Quercus</i> FQ	<i>Olea</i> 2 FO2
Taux de flavonoïdes en mg EqQ/g de MS	11,5	6,78	23,5	17,2	5,77	5,04	6,096

Tableau V(b) : Taux de flavonoïdes dans les extraits éthanoliques des différentes parties des plantes *Daphné*, *Ecballium* et *Tamus*.

Plantes	<i>Daphné</i>			<i>Tamus</i>		<i>Ecballium</i>			
	Racine RD	tige TD	feuille FD	grain GT	tige TT	tige TE	racine RE	fruit FrE	feuilles FeE
Taux de flavonoïdes en mg EqQ/g de MS	7,52	45,1	82,68	0,38	2,21	< 1	< 1	< 1	21,61

Les teneurs en flavonoïdes varient de 2 à 83 mg EqQ/g de MS. Le taux le plus élevé est observé pour les feuilles de *Daphné* (82,68 mg EqQ/g de MS) alors que les extraits de tige, racine ou fruit d'*Ecballium* ne contiennent pratiquement pas de flavonoïdes. En effet, les taux sont inférieurs à 1 mg EqQ/g de MS. La sensibilité du test de dosage et la limite de solubilité des extraits ne permettent pas de déterminer des teneurs en flavonoïdes plus faibles. Les taux de flavonoïdes obtenus peuvent être de même ordre de grandeur par

rapport aux résultats de certains travaux publiés comme ceux de **Benchikh et Louailéche, (2014)** qui ont trouvé que la teneur en flavonoïde de *Ceratonia* est 17mg EqQ/gMS malgré que le solvant utilisé est l'acétone.

III.3. Taux de protéines et activités enzymatiques des extraits d'amylases et d'acétylcholinestérase

La teneur en protéines dans les trois extraits enzymatiques a été réalisée par dosage colorimétrique selon la méthode de **Bradford (1976)**. Les taux de protéines dans les trois extraits enzymatique d'orge, de Médamylase et de ver de terre sont de 1,25mg/ml, 1,09mg/ml et 4,64mg/ml (**Tableau VI**). Les activités enzymatiques (exprimé en UI/mg ($\mu\text{mol}/\text{min. mg}$) d'amylase et acétylcholinestérase sont déterminées par les tests colorimétrique spécifiques indirect (dosage du glucose produit par hydrolyse enzymatique de l'amidon) au DNS pour l'amylase et dosage colorimétrique par la méthode **d'Ellman et al, (1961)** pour l'acétylcholinestérase .

Le **Tableau VI** montrent que l'extrait enzymatique de ver de terre (acétylcholinestérase) est plus riche en activité enzymatique que l'extrait enzymatique obtenu de l'orge (amylase).

Tableau VI: Taux de protéines totales, activités enzymatiques totales et activités spécifiques des extraits enzymatiques.

	Taux de protéines (mg/ml)	Protéines total (mg)	Activité en U/mg	Activité totale en U
Amylase de l'orge germé.	1,25 \pm 0.032	106,25 \pm 2,72	1,23	130,9
Amylase de médamylase	1,09 \pm 0.033	7,63 \pm 0,231	1,44	11
Acétylcholine estérase du Ver de terre	4,64 \pm 0,010	83,52 \pm 0,18	8.62	719.9

III.4. Température et pH optimum estimés des amylases extraites

III.4.1. Température optimale de l'activité des amylases

Pour chaque enzyme, il existe une température optimale. Au dessus ou en dessous de cette température, l'activité de l'enzyme décroît (les liaisons faibles qui stabilisent la protéine se rompent et la molécule est dénaturée) (**Christian, 2006**).

L'estimation de la température optimale par teste colorimétrique au lugol se basant sur les changements de couleurs et leurs intensités (**Tableaux VII et VIII**). Suite à l'hydrolyse enzymatique de l'amidon à différents températures (**Figures 7 et 8**) montre que la température optimale de l'amylase de l'orge est d'environ 50 °C alors que celle de l'extrait du médicament est d'environ 37°C.

En effet, pour l'amylase de l'orge, une dégradation presque complète de l'amidon est noté des les 45 min à 50°C (couleur jaune indicateur d'épuisement de l'amidon), alors qu'aux températures 20, 37, 60 et 70°C même après 60min de réaction l'amidon n'est pas ou peu dégradé comme le montre la couleur bleu ou marron des solutions. Nos résultats sont en accord avec ceux établie par **MacGregor ,(1978)** pour la température optimale de l'activité de l'amylase qui est de 55 °C.

Tableau VII : Influence de la température sur l'amylase de l'orge

temps Temp	0 min	15min	30min	45 min	60 min
20°C±2°C	Bleu foncé ++++	Marron foncé +++±	Marron foncé +++	Marron foncé +++	Marron foncé +++±
37°C	Bleu foncé ++++	Marron +++	Marron +++	Marron ++±	Marron ++±
50°C	Bleu foncé ++++	Marron +++	Marron +++±	Jaune ++	Jaune ±±
60°C	Bleu foncé ++++	Marron +++	Marron ++±	Marron ++	Marron ++
70°C	Bleu foncé ++++	Marron +++	Marron +++	Marron +++	Marron +++

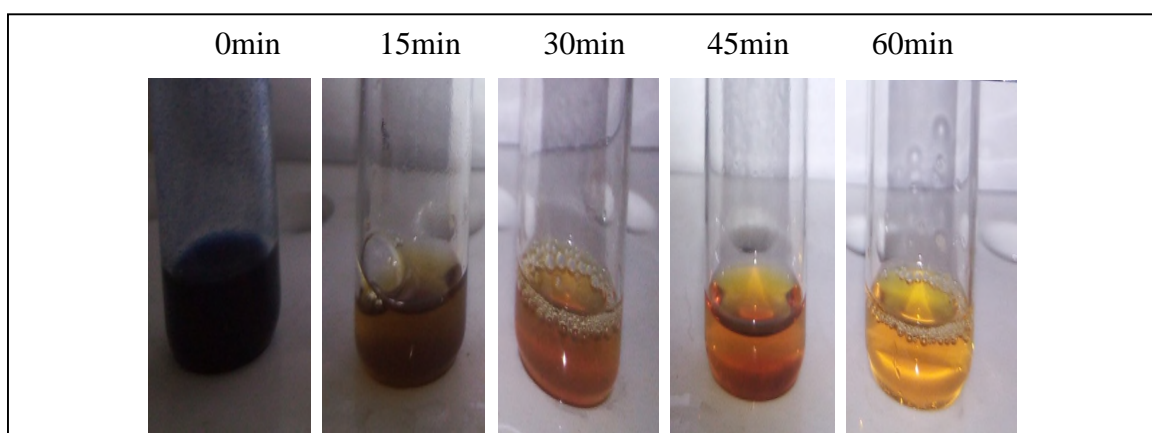
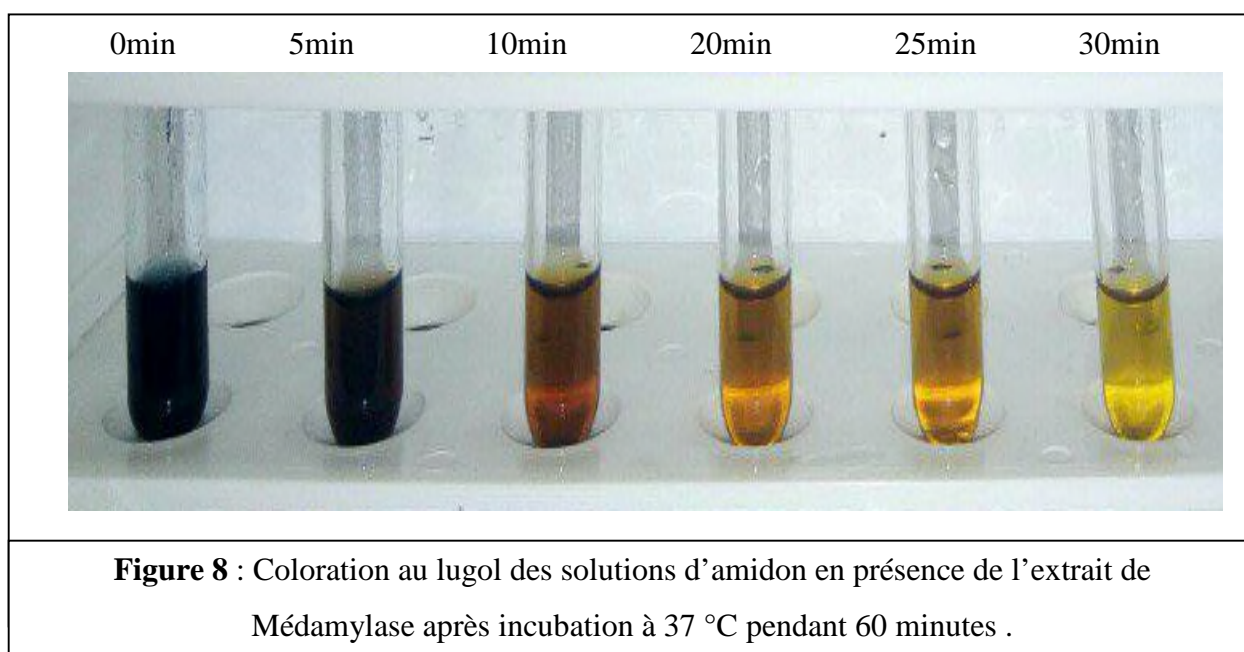


Figure 7: Résultats de la coloration au lugol des solutions d'amidon en présence de l'extrait de l'orge après incubation à 50 °C pendant 60 minutes.

Pour l'amylose qui constitue le principe actif du Médamylase, après 25 min de réaction, à 37°C, on observe une totale dégradation de l'amidon (couleur jaune). La réaction est ralentie lorsque la température est de 20-22°C où on note que la dégradation enzymatique de l'amidon n'est complète qu'après 30min de réaction. Pour les températures de 50°C et 60°C, même après 30min de réaction, peu d'amidon sont dégradés « couleur marron ». Alors qu'à 70°C, il semblerait que l'enzyme soit inactive puisque même après 30min de réaction, on ne note aucun changement de la couleur bleu caractéristique de la présence d'amidon

Tableau VIII: Influence de la température sur l'activité de l'amylose de Médamylase

Temps	0min	5 min	10min	20 min	25min	30min
Température						
20°C±2°C	Bleu foncé ++++	Marron foncé +++±	Marron +++	Marron +++	Jaune-marron ++	Jaune ±
37°C	Bleu foncé ++++	Marron foncé +++	marron +++	Jaune-marron ++	Jaune ±	Jaune +
50°C	Bleu foncé ++++	Marron foncé +++±	Marron ++++	Marron +++	Marron ++	Jaune-marron ++
60°C	Bleu foncé ++++	Bleu Violet ++++	Bleu Violet +++	Marron foncé ++++	Marron foncé +++	Marron foncé +++
70°C	Bleu foncé ++++	Bleu foncé ++++	Bleu foncé ++++	Bleu foncé ++++	Bleu foncé ++++	Bleu foncé +++



III.4.2. pH optimum estimé de l'activité des amylases

Il existe aussi un pH optimum qui assure à chaque enzyme une activité maximale. Celui de la majorité des enzymes se situe entre 6 et 8 (**Christian, 2006**). Les pH optimum des activités enzymatiques des amylase de l'orge et de celle du Médamylase estimées par le test au lugol sont respectivement de pH5 et pH7, comme l'indique les changements de couleurs des solutions d'amidon colorées au lugol après 10min de réaction de dégradation enzymatique à température optimale (**Figures 9 et 10**). Les changements de couleur du bleu foncé vers le jaune se produisent plus rapidement lorsque la réaction aux pH mentionnés (**Tableaux IX et X**). Pour l'amylase de l'orge, nos résultats concordent avec ceux publiés par **MarGregor , (1978)** où le pH optimum de l'amylase d'orge est 5,5 .

Tableau IX : Influence de pH sur l'amylase de l'orge à température optimale

pH \ temps	Sans enzyme	0min	10min	20 min	30min
pH=4	Bleu foncé ++++	Marron +++	marron +++	Jaune verdâtre ++	Jaune verdâtre ++
pH = 5	Bleu foncé ++++	Marron +++	Jaune ++	Jaune +	Jaune +
pH =6	Bleu foncé ++++	Marron +++	Jaune ++±	Jaune ++	Jaune +
pH =7	Bleu foncé ++++	Marron +++	Jaune marron ++	Jaune Marron ++	jaune ++
pH =8	Bleu foncé ++++	Marron +++	Marron +++	Marron +++	jaune ++

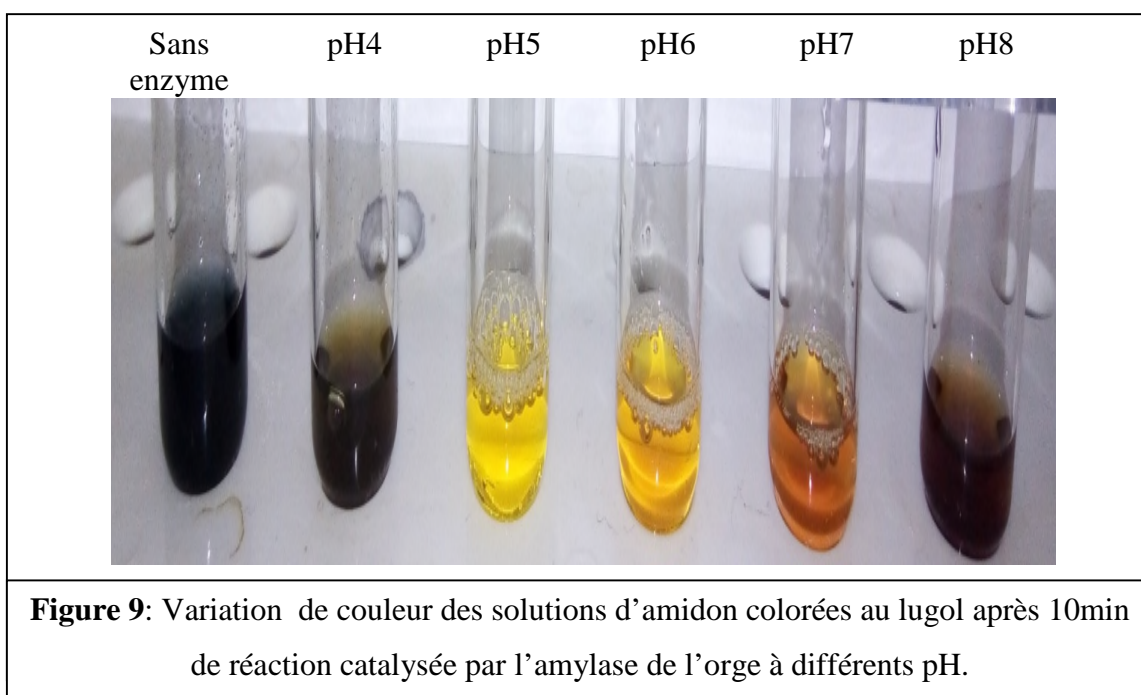
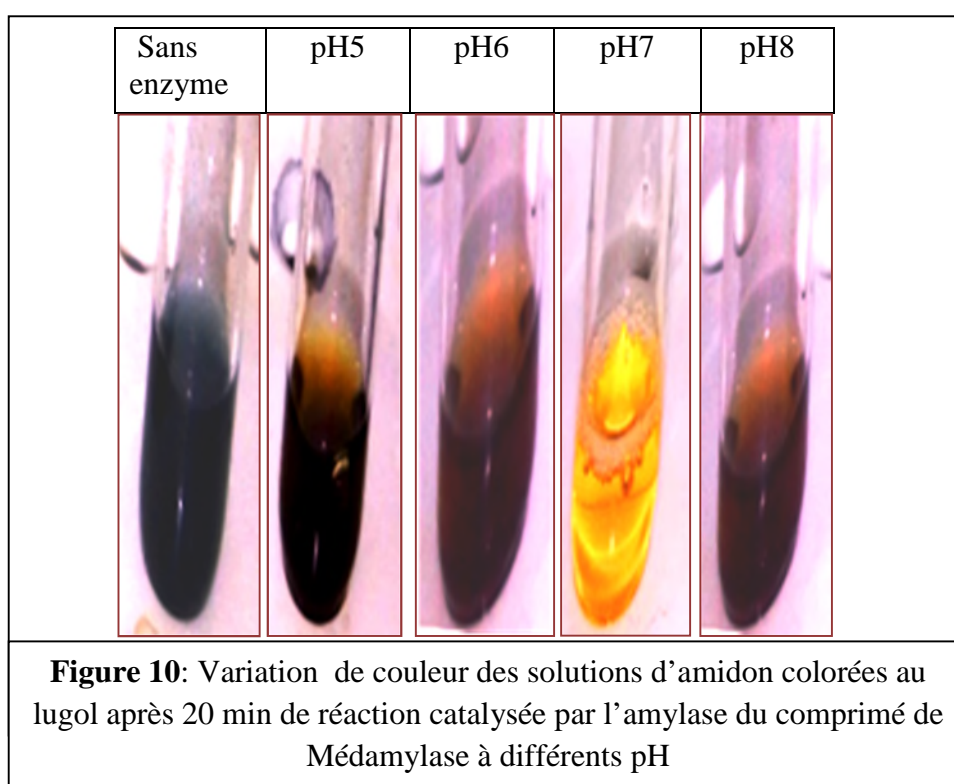


Tableau X : Influence de pH sur l'amylose de Médamylase a température optimale

temp / pH	Sans enzyme	0 min	10 min	20 min	30 min
pH=5	Bleu-vert ++++	Marron-vert +++	Marron vert +++	Marron +++	Marron-Jaune ++
pH=6	Bleu-vert ++++	Marron-vert +++	Marron vert +++	Marron ++±	Jaune ++
pH=7	Bleu-vert ++++	Marron ++±	Marron ++±	Jaune ++	Jaune +
pH=8	Bleu-vert ++++	Marron-vert +++	Marron ++±	Marron +++	Marron ++±



III.5. Activité anti-enzymatique des extraits des plantes

Les plantes sont des sources de métabolites secondaires comme les flavonoïdes à propriétés biologiques diverses et très intéressantes de part leurs potentiel d'application dans divers domaines notamment dans le domaine du médicament. Ces métabolites sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, de légumes ou de boissons dérivés. La bio activité de ces métabolites passe en générale par la modulation de l'activité de certaines enzymes ce qui conduit à la modification du comportement de plusieurs systèmes cellulaire suggérant qu'il pourraient exercé une multitude d'activité

biologique notamment des propriétés antioxydants, anti-allergique, anti-inflammatoire, antidiabétique, anti-tumorale ou autre..ect . (Ghdira, 2005).

Dans le but d'identifier si les plantes sélectionnées dans cette étude ont un potentiel antidiabétique et/ou anti Alzheimer, des enzymes cibles thérapeutiques potentielles de ces deux pathologies, en l'occurrence l'amylase et l'acétylcholinestérase respectivement, ont été utilisés comme cibles d'étude anti-enzymatique.

III.5.1. Activité anti-amylase

L'activité anti amylasique *in vitro* de nos extraits a été évaluée par l'utilisation du test colorimétrique indirect du dosage du glucose, produit par hydrolyse enzymatique de l'amidon, par le DNS en utilisant une amylase végétale comme model « amylase de l'orge » et une amylase constituant actif d'un médicament « le Médamylase » probablement l'amylase salivaire ou l'amylase intestinale.

Les résultats des tests d'inhibition (**Tableaux XI(a) ,XI(b) , XII(a) et XII(b)**), n'ont montré aucun effet inhibiteur quelque soit l'extrait de plantes utilisé aussi bien pour l'amylase de l'orge ou pour l'amylase du médicament malgré que nos extraits de plantes sont riche en flavonoïdes.

Tableau XI(a): Taux d'inhibition de l'activité de l'amylase « Médamylase » par les extraits de différentes parties des plantes : *Daphne Thamus, Ecballiume*.

	Activité enzymatique.	Taux d'inhibition en présence de 1mg/ml d'extrait végétale (%)								
		RD	TD	FD	GT	TT	TE	RE	FrE	FeE
Activité en U/mg	1,88	2,15	2,05	2,051	1,81	1,97	2.06	1,99	2,00	1,76
% inhibition	--	0%	0%	0%	6%	0%	0%	0%	0%	8%

RD : racine *Daphne*, TD : tige *Daphne*, FD : feuille *Daphné*, GT grain *Tamus*, TT : tige *Tamus* ...

Tableau XI(b): Taux d'inhibition de l'activité de l'amylase « Médamylase » par les extraits de feuilles de différentes plantes testées.

	Activité enzymatique	Taux d'inhibition en présence de 1mg/ml d'extrait végétale (%)						
		FP	FA	FCe	FCr	FO1	FQ	FO2
Activité en U/mg	2,52	2,02	2,89	2,86	2,87	2,89	2,96	2,73
Taux d'inhibition (%)	_	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

FP :feuille pistachier,FA :feuille arbutus,FCe :feuille ceartonia,FO1 :*Olea 1*,FQ :feuille *Quercus*,FO2 :feuille *Olea2*

Tableau XII(a):Taux d'inhibition de l'activité de l'amylase de l'orge par les extraits de différentes parties des plantes :(*Daphné, Tammus, Ecballium*)

	Activité enzymatique	Taux d'inhibition en présence de 1mg/ml d'extrait végétale (%)								
		RD	TD	FD	GTh	TTh	TE	RE	FrE	FeE
Activité en U/mg	1,78	1,82	1,87	1,93	2,12	1,89	1,94	1,92	1,97	1,88
Taux d'inhibition (%)	–	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Tableau XII(b) :Taux d'inhibition de l'activité de l'amylase de l'orge par les extraits de feuilles de différentes plantes testées.

	Activité enzymatique	Taux d'inhibition en présence de 1mg/ml d'extrait végétale (%)						
		FP	FA	FCe	FCr	FO1	FQ	FO2
Activité en U/mg	1,84	2,07	2,02	2,08	2,02	2,06	2,00	2,06
Taux d'inhibition (%)	–	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Si on compare nos résultats de l'effet des extraits des plantes sur les amylases (d'orge et de Médamylase) avec ceux de la bibliographie , on constate que nos extraits ne contiennent pas des composés bioactifs à effet inhibiteur de l'activité des amylases, par rapport aux résultats obtenus par **Swamy ganjay et al, (2017)** sur l'extrait éthanolique de l'écorce de *Terminalia paniculata* avec un taux d'inhibition de 81%, par **Vadivel et Biesealski,(2011)** sur l'extrait méthanolique des graines de *Pongamia pinnata* avec un pourcentage d'inhibition de 77,92 % et aussi à ceux de **Ping Ang et al , (2015)** qui ont trouvé un taux d'inhibition de 15,36 % pour l'extrait méthanolique des feuilles de *Gluta torquata*.

Malgré que l'extrait de *Daphné* est riche en flavonoïdes, il n'exerce aucun effet inhibiteur. Au contraire, celui des feuilles *Nelumbo nucifera* riche en flavonoïde présente un bon effet inhibiteur (IC₅₀= 0,38±0,022 mg/ml) **Liu et al,(2013)**. Cela nous conduit à dire que l'activité inhibitrice est due à des substances autres que les flavonoïdes ou que les flavonoïdes actifs de *Nelumbo nucifera* et ceux de *Daphné* n'appartiennent pas aux mêmes classes.

III.5. 2. Activité anti-acétylcholinestérase

Les résultats d'étude de la cinétique d'acétylcholinestérase du ver de terre, exprimée en $\Delta DO/min$, en présence d'une concentration unique 1 mg/ml d'extraits éthanoliques des différentes plantes testées montrent des comportements cinétiques différents selon l'identité de la plante utilisée (**Figures 11 et 12**). Ainsi, les extraits de feuilles de *Pistachier*, d'*Olea1*, et *Daphné* et l'extrait de tige de *Daphné* ont un comportement inhibiteur. Les extraits de feuilles de *Quercus* et de feuilles d'*Olea 2* ainsi que les extraits de racine de *Daphné*, de tige de *Tamus* et de fruit d'*Ecballium* n'ont aucun effet alors que ceux des feuilles de *Crataegus*, de *Ceratonia* et d'*Arbutus* et les extraits de graine de *Tamus*, tige, racine et feuilles d'*Ecballium* présentent un comportement cinétique d'activateur.

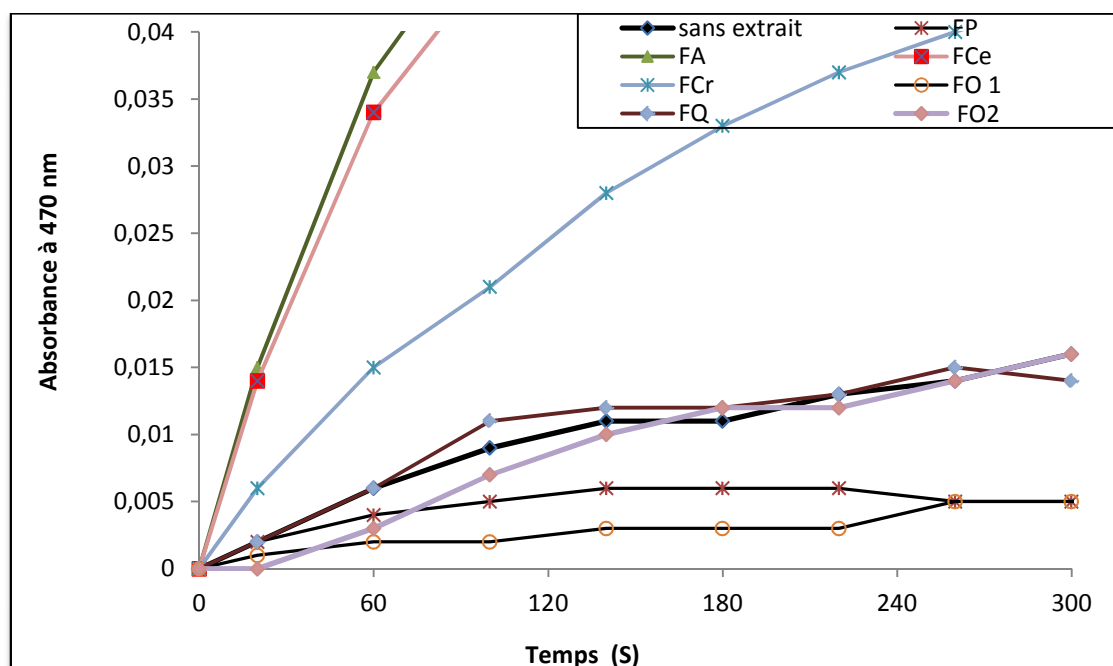


Figure 11 : Cinétique de l'acétylcholinestérase en absence et en présence de 1mg/ml des extraits éthanoliques des feuilles de différentes plantes de la région de Kabylie.

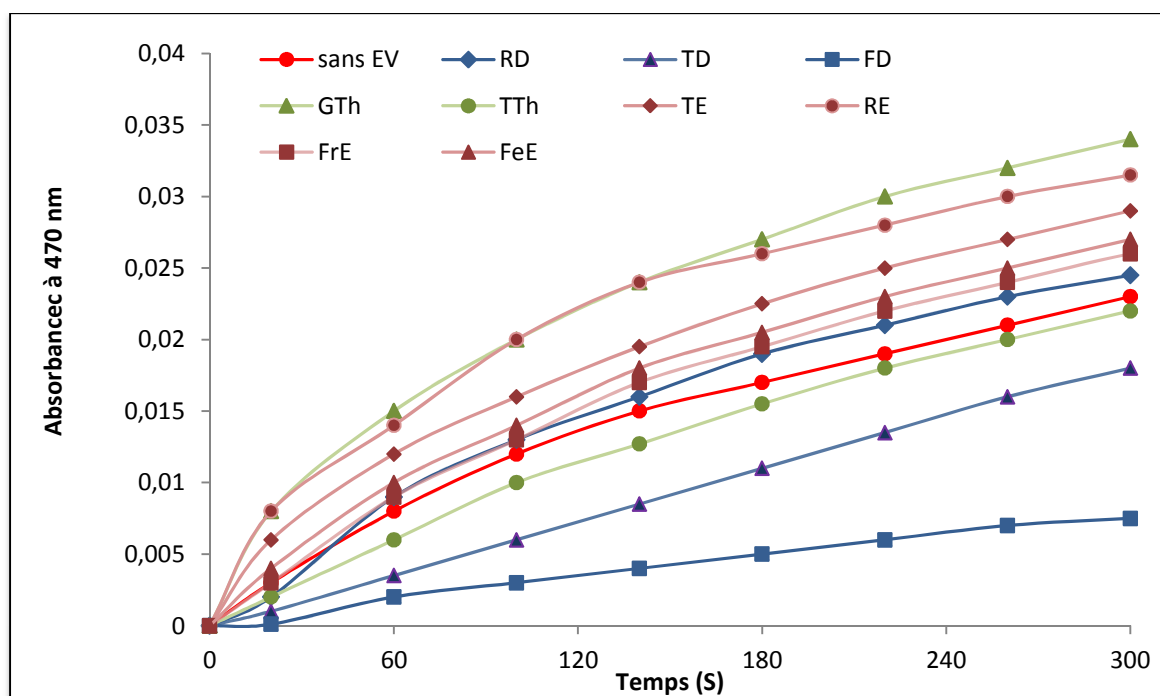


Figure 12 : Cinétique de l'acétylcholinestérase en absence et en présence de 1mg/ml des extraits éthanoliques de différentes parties des plantes *Ecballium*, *Daphné* et *Tamus* .

Les taux d'inhibition pour les extraits à comportement inhibiteur de l'ACHé varient de 33 à 75 % (Tableau XV). L'extrait éthanolique des feuilles de *Daphné* présente le meilleur taux d'inhibition, avec 75% d'inhibition pour une concentration de 1mg/ml.

Tableau XV: Taux d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits éthanolique de plantes.

	Activité enzymatique sans EV	Activité enzymatique en présence de 1mg/ml d'extrait éthanolique de plante			
		FP	TD	FD	FO1
Activité Enz. $10^{-3}\Delta DO/\text{min}$	6	4	3,5	2	2
Taux d'inhibition (%)	-	≈ 33 %	≈56%	≈75%	≈ 66 %

Le résultat d'inhibition obtenu pour les feuilles de *pistachier* (33%) est comparable à celui de **Peksel et al** , 2013 (50%) bien que le solvant d'extraction utilisé n'est pas le même. En effet, **Peksel et al** ont réalisé une extraction à l'eau sur les feuilles de *Pistachier* alors que dans ce travail, l'extraction a été réalisée à l'éthanol.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de l'activité anti-amylase et anti-acétylcholinestérase des extraits éthanoliques de différentes plantes de la région de la Kabylie. Les parties végétales utilisées pour l'extraction sont les Feuilles de 7 différentes plantes, *Pistachier* (FP), *Arbutus* (FA), *Ceratonia* (FCe), *Crataegus* (FCr), *Olea 1* (FO1), *Quercus* (FQ), *Olea 2* (FO2), et les racines, fruits, feuilles, tiges et/ou gaines de 3 plantes, racine et tige de *Daphné* (RD et TD), racine, feuille et fruit d'*Ecballium*, (RE, FeE et FrE), graine et tige de *Tamus* (GT et TT).

La présente étude a montré que les différents extraits des plantes testées renfermant des teneurs en flavonoïdes qui varie entre 0,38 et 82,68 mg EqQ /gMS, n'ont pas d'activité anti-amylases (orge et Médamylase). Par contre, ils ont des comportement cinétique différents sur l'acétylcholinestérase selon l'identité de la plante. Quatre extraits ont un effet inhibiteur sur l'activité de l'acétylcholinestérase avec des taux d'inhibition de 33% (feuille de *Pistachier*), 66% (feuille de *Olea1*), 56 % (tige de *Daphné*), 75 % (feuille de *Daphné*). Sept extraits ont un effet activateur, ce sont les extraits de grains de *Tamus*, tiges, racines et feuilles d'*Ecballium*, les feuilles de *Crataegus*, de *Ceratonia* et d'*Arbutus*.

L'ensemble des résultats obtenus au fil de cette étude n'est qu'une étape préliminaire dans la recherche. Alors, il est souhaitable d'accomplir et d'enrichir ce travail, entre autres, dans l'immédiat par :

- ❖ La Confirmation des effets anti-enzymatique de ces extraits bruts sur des enzymes purifiées et étendre les essais à d'autres enzymes cibles thérapeutique de ces deux pathologies.
- ❖ Le fractionnement des extraits de plantes à effet inhibiteur de manier à les enrichir par les différents classe de flavonoïdes, identifier les fractions anti-enzymatique et évaluer leurs efficacités.

Références bibliographiques

(A)

- **Ameenah Fakim A ,(2006).** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow *Molecular Aspects of Medicine*. 27. 1-93 .
- **Amessis-Ouchemoukh Nadia , Madani Khodir , LV Falé Pedro, Serralheiro M. Luisa , Araújo Maria Eduarda M, (2014).** Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products* .53. 6-15.
- **Anglais Brett .A , Webster Andrew A ,(2011).** Chapter 132 – Acetylcholinesterase and its Inhibitors. *Primer on the Autonomic Nervous System (Third Edition)*. 631-633.
- **Arruda Miguel , Viana Hugo, Rainha Nuno , Nuno R. Neng , Silvino José Rosa , MF Nogueira José, Maria do Carmo Barreto,(2012).** Anti-acetylcholinesterase and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Hedychium gardnerianum* Sheppard ex Ker-Gawl. *Molecules* . 17,(3). 3082-3092.
- **Ashok Kumar .B.S, Lakshman.S, Jayaveea .K.N , Sheshadri Shekar .D , Khane Saleemulla , Thippeswamy .B.S, Veerapur Veeresh P,(2012).** Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of methanolic extract of *Amaranthus viridis* Linn in alloxan induced diabetic rats . *Experimental and Toxicologic Pathology*.64. 75-79.
- **Ashok Kumar .B.S , Lakshman .K, Nandeesh .R, Arun Kumar P.A, Manoj Vinod Kumar.B , Sheshadri Shekar .D,(2011).** In vitro alpha-amylase inhibition and in vivo antioxidant potential of *Amaranthus spinosus* in alloxan-induced oxidative stress in diabetic rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*.18. 1-5.

(B)

- **Beaudeau Jean-Louis ,Durand Geneviève ,(2008).** *Biochimie médicale-Marqueurs actuels et perspectives*. 2^{ème} édition. Edition :Médecine Sciences Publications Lavoisier .Paris . 608 p.
- **Benchikh Yassine , Louailèche Hayette ,(2014).** Effects of extraction conditions on the recovery of phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp. *Journal Acta Botanica Gallica: Botany Letters*. 161, (2) . 175-181.
- **Bliss TVP, Collingridge GL,(1993).** A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus .*Nature*. 361, (6407). 31-39.

- **Boonyaketguson Sirada, Rukachaisirikul Vatcharin , Phongpaichit Souwalak , Trisuwan Kongkiat, (2018).**Naphthoquinones from the leaves of *Rhinacanthus nasutus* having acetylcholinesterase inhibitory and cytotoxic activities.Fitoterapia.124. 206-2010.
- **Boussoufa D, Ghazali N, Masmoudi W, El cfsi M,(2012).** Suivi saisonnier de l'activite acetylcholinesterase et de quelques metaux traces chez le bivalve donax trunculus du golfe de Tunis. Journal de la Société Chimique. 14. 83-94.
- **Bril Antoine, Combettes Murielle et Huet-Gihr Dorothée, (2013).**Repenser le traitement du diabète pour mieux soigner les patients . 29, (8-9) . 683 – 684 .

(C)

- **Charbonnel.B, (2010).** Les stratégies thérapeutiques du diabète de type 2 Type 2 diabetes treatment main options. La Lettre du Pharmacologue. 24,(3). 78-91.
- **Christian Moussard ,(2006).** Biochimie structurale et métabolique . 3^{eme} édition .Edition De Boeck et Larcier .Belgique.352 p.
- **Contestabile Antonio ,(2011).** The history of the cholinergic hypothesis. Behavioral Brain Research. 221. 334-340.

(D)

- **Delacourte .A ,(2000).**Histoire naturelle et moléculaire de la maladie d'Alzheimer. Annales de biologie clinique.58, (3). 350-355 .
- **Delacourte.A,(2005).** Modélisation de la maladie d'Alzheimer : un parcours semé d'embûches. Psychol NeuroPsychiatr. 3,(4). 261-270 .
- **Derouesné Christian, Selmès Jacques, (2005).** La maladie d'Alzheimer: Comportement et humeur.John Libbey Eurotext. Paris. 283p.
- **Djeridane. A, Yousfi. M, Nadjemi. B, Boutassouna. D, Stocker. P, Vidal. N, (2006).** Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts compound. Food Chemistry. 97. 654-660.
- **Drouind.P, Blickle .J.F, Charbonnel .B, Eschwege .E, Guillausse .P.J, Plouin .PF, Daninos .J.M, Balarac .N, Sauvanet J.P,(1999).** Diagnostic et Classification du diabete sucre . Diabetes & Metabolism .25 .72-83.
- **Dubois. M, Gilles. K.A, Hamilton, Rebers J. K. , P. A. , Smith F, (1956).** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances . Anal Chem. , 28, (3) .350–356 .

- **Duraffourd Christian, Lapraz Jean-Claude** , (2002).Traité de Phytothérapie Clinique. Editions :Masson. Paris . 864 p.

(E)

- **Ellman, G.L, Courtney. K.D, Andres. V, Featherstone. R.M**, (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol.7. 88-95.
- **Ercan Pinar, Nehir El Sedef**,(2016).Inhibitory effects of chickpea and tribulus terrestris on lipase, α -amylase and α -glucosidase . Food Chemistry .205 .163-169.

(F)

- **Faure S**,(2008). Médicaments de l'Alzheimer .Actualités Pharmaceutiques. 47 , (474) . 43-46.
- **Falleh .H, Ksouri .R, Chaieb. K, Karray-Bouraoui. N, Trabelsi . N, Boulaaba. M ,Abdelly .C**, (2008). Phénolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. C. R. Biologie. 331. 372-379.
- **Foretz Marc** , **Viollet Benoit** ,(2014) . Les nouvelles promesses de la metformine Vers une meilleure compréhension de ses mécanismes d'action. médecine/sciences.30 . 82-92.
- **Foubert-Samier Alexandra** , **Goize Cyril**, (2010).Génétique et maladie d'Alzheimer. Neurologie.com. 2, (8) . 194-196.
- **Françoise Forette**,(2009). Maladie d'Alzheimer: perspectives thérapeutiques gérontologie et société. Gérontologie et société. 32,(128-129). 209-223.

(G)

- **Ganzler K., Salgó A., Valkó K.**, (1986). Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography.Journal of chromatography. 371. 299-306.
- **Ghdira k**,(2005). Les flavonoïdes : structure ,propriétés biologique, rôle prophylactique et emploi en thérapeutique . phytothérapie. 3. 162-169.
- **Govaerts.L, Schoenen .J, Bouhy .B**, (2007). Pathogénie de la maladie d'alzheimer : les mécanismes moléculaires et cellulaires. Rev Med Liege.62, (4),pp: 209-215.
- **Greenamyre JT, Porter RH**, (1994) . Anatomy and physiology of glutamate in the CNS . Neurology. 44 . 7-13 .
- **Greenamyre JT, Young AB**,(1989). Axcitatory amino acids and Alzheimer's disease . Neurobiology of Aging. 10 ,(5).593-602.

- **Grimaldi.A, Hartemann.A, Heurtier, Jacqueminet.S, Bosquet.F, Masseboeuf.N, Halbron. M, Sachon.C ,(2009).**Guide pratique du diabète.4^{eme} édition . Edition :Elsevier Masson. 286 p .
- **Groop LC, DeFronzo RA, (1998).** Sulfonylureas.In RA De Fronzo. editor,Current management of diabete mellitus, St Louis (MO): Mosby-Year Book. 96-101.
- **Grossberg T George, (2003).** Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. Curr. Ther. Res. 64,(4). 216-235.
- **Guang Ma Wei , Xiang Tan Ren , Nicola Fuzzati , Hostettmann Kurt , Sheng Li Qing , Wolfender Jean-Luc , Hostettmann Kurt , (1997).** Natural occurring and synthetic polyynes glycosides. Phytochemistry, 45,(2). 411- 415 .
- **Gur A, Cohen A, Bravdo B.A,(1969).** Colorimetric method for starch determination ; *J. Agric. Food Chem* . 17, (2). 347–351

(*H*)

- **Holz GG,(2004).** Epac: a new cAMP-binding protein in support of glucagons like peptide-1 receptor mediated signal transduction in the pancreatic beta cell. *Diabetes*.53. 5-13.

(*I*)

- **Iqbal Khalid, Grundke-Iqbal Inge ,(2010).** Alzheimer Disease, a Multifactorial Disorder Seeking Multi-therapies. *Alzheimer's & Dementia* .6 . 420-424.

(*K*)

- **Kiendrebeogo Martin , Coulibaly. Y Ahmed , C. H. Nebie Roger , Zeba Boukaré , E. Lamien Charles, Lamien-Meda Aline , Odile G. Nacoulma,(2011).** Antiacetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from six medicinal plants from Burkina Faso . *Brazilian Journal of Pharmacognosy*.26, (1) . 63-69.

(*L*)

- **Layer P. et al, (1987).** Mayo clinical proceedings .61, (2). 442-447.
- **Letrilliart Laurent, Pouchain Denis ,(2011).**La prise en charge thérapeutique de la maladie d'Alzheimer et des démences apparentées. *la revue française de médecine générale*.22, (97). 100-108.
- **Leuba G, Büla C, Schenk F, (2013).**Du vieillissement cérébral à la maladie d'Alzheimer. Edition ; 2^{eme} édition. Edition ;De BoeckP . 416 p .

- **Liu Song, Li Dong, Huang Bo , Chen Yuxin , Lu Xiaocong, Wang Youwei ,(2013).** Inhibition of pancreatic lipase, α -glucosidase, α -amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbo nucifera* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*.149. 263-269.
- **Luque de Castro M.D., Priego-Capote F,(2010) .** Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*. 1217,(16). 2383-2389.

(*M*)

- **MacGregor A.W ,(1977).** Isolation, purification and electrophoretic properties of an α -amylase from malted barley. *Journal of institute of brewing*.83.100-103
- **MacGregor A.W, (1978) .** α -Amylase i from malted barley-physical propreties and action pattern on amylose .*The american association of cereal chimists*.55, (5). 754-765.
- **Marc Dhenain, Stéphane Lehéricy Charles, Duyckaerts,(2002).** Le diagnostic : de la neuropathologie à l'imagerie cérébrale.*médcine et science*.18,(6-7). 697-708.
- **Marc Foretz , Benoit Viollet , (2014) .** Les nouvelles promesses de la metformine Vers une meilleure compréhension de ses mécanismes d'action. *médecine/sciences*.30 . 82-92.
- **Marion M. Bradford,(1976).** A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* .72.pp: 248-254 .
- **Marshall J.J. et Lauda C.M, (1975)** *J. of Biol, Chemistry* . 250, (20). 8030-8037.
- **Millar Wayne J. ,Young T. Kue ,(2003) .** Évolution du diabète :prévalence, incidence et facteurs de risque. *Rapports sur la santé*. 14,(3) .p :41.

(*N*)

- **Nawaz .H , Shi .J, Mittal G.S, Kakuda.Y, (2006).** Extraction of polyphénols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. 4. 176-181.
- **Nourhashémi.F,(2006).**Actualités et perspectives thérapeutiques de la maladie d'Alzheimer. *La Revue de Médecine Interne*. 27,(8). 585-587.

(*O*)

- **Orsini Jean-Claude, Jean Pellet, Georgette Apicella , Isabelle Le Roy,Collectif , (2006).** Introduction biologique à la psychologie. 2^{ème} édition. Edition : Bréal . 553 P.

(P)

- **Parsons CG, Stöffler A, Danysz W, (2007)** . Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system-too little activation is bad, too much is even worse . *Neuropharmacology* .53,(6). 699–723.
- **Peksel Aysegul , Arisan Inci , Yanardag Refiye ,(2013)**. Radical scavenging and anti-acetylcholinesterase activities of aqueous extract of wild pistachio (*Pistacia atlantica* Desf.) leaves. *Food Science and Biotechnology*. 22,(2). 515–522.
- **Ping Ang Lily Zuin , Hashim Rokiah , Sulaiman Shaida Fariza , Coulibaly Ahmed Yacouba, Sulaiman Othman , Kawamura Fumio , Mohd Salleh Kushairi.(2015)**.In vitro antioxidant and antidiabetic activities of *Gluta torquata*. *Industrial Crops and Products*.76 . p: (755-760).

(Q)

- **Quetu .F , Prunier .C , Pogam Le , Hommet. C , Tamagnan .G , Allard .M , Guilloteau. D , Seibyl .J , Baulieu J.L, (2009)** . Imagerie moléculaire du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACH) par le 5-iodobenzovézamicol dans la démence de type Alzheimer. *Medecine nucléaire*. 3. 338 -351.
- **Quettier-Deleu, Gressier.C, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C et Luyckx, M,(2000)**. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hull and flour. *Journal of Ethnopharmacology*. 72. 35-42.

(R)

- **Rabasa-Lhoret Rémi, Chiasson Jean-Louis,(2000)** .Inhibiteurs des alphaglucosidases . *Médecine thérapeutique / Endocrinologie* . 2,(3) . 198-204.
- **Ryan. L, (2013)**. Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green, and white teas. *Internationaljournaloffoodscience*,2013. 6.
- **Reza ASM Ali , Shahadat Hossain Mohammad , Akhter Sharmin , Md. Rezanur Rahman , Mst. Samima Nasrin , Josim Uddin Md , Golam Sadik , Alam AHMKhurshid, (2018)**. In vitro antioxidant and cholinesterase inhibitory activities of *Elatostema papillosum* leaves and correlation with their phytochemical profiles: A study relevant to the treatment of Alzheimer's disease.*BMC Complementary and Alternative Medicine*.18,(1) . 123 .

- **Ribereau-Gayon. P,(1972).** Propriétés chimiques des phénols. In “ les composés phénoliques des végétaux ”. Edition Dunod .Paris. 29-57 p.
- **Robinson DM, Keating GM, (2006).** Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease . Drugs. . 66, (11) . 1515–1534.
- **Romli Hajar ,(2016)** .Prise en charge et traitement du diabete de type 2.Thèse pour l’obtention du Doctorat en Pharmacie. Université Mohammed V RABAT .Faculte de médecine et de pharmacie de RABAT . 80 p.

(S)

- **Sahoré Alexis Drogba, Abouttier Joachim Levry, (2016).** Quelque méthode d’analyse biochimique de produit alimentaire . Editions : Connaissance et savoir .Saint Denis . 94 p.
- **Seebaluck Sandoram R, Lall.N , Fibrich.B, Staden A.Blom van, Mahomoodally F, (2017).** Antibiotic-potential,antioxydant,cytotoxic, antiinflammatory and antiacetylcholinesterase potential of *Antidesma madagascariense* Lam. (Euphorbiaceae).South African Journal of Botany.111. 194-201.
- **Seema Begum , Mumtaz Ali, Husna Gul, Waqar Ahmad, Sultan Alam, Khan Momin ,Mir Azam Khan , Manzoor Ahmad ,(2012).** In vitro enzyme inhibition activities of *Myrtus communis* L. African Journal of Pharmacy and Pharmacology . 6,(14). 1083 – 1087.
- **Sherifali D, Nerenberg K, Pullenayegum E et al,(2010).** The effect of oral antidiabetic agents on A1C Levels. A systematic review and meta-analysis. Diabetes Care. 33 . 1 859-1 864.
- **Swamy Ganjayi Muni, Meriga Balaji, Hari Balaji, Oruganti Lokanatha , Dasari Sreenivasulu , Mopuri Ramgopal. (2017) .** PolyPhenolic rich fraction of *Terminalia paniculata* attenuates obesity through inhibition of pancreatic amylase, lipase and 3T3-L1 adipocyte differentiation . Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism .10 .p: (19-25).

(T)

- **Thoma J.A ,French D, (1960).** The Starch-Iodine-Iodide Interaction.PartI. Spectrophotometric Investigations, J. Am. Chem. Soc .82, (16), 4144–4147.

- **Thorel Fabrizio ,Herrera Pedro L, (2010).** Génération de cellules b-pancréatiques par conversion spontanée de cellules a chez des souris diabétiques .médecine et science.26. 906-909.
- **Thorens B,(1992).** Expression cloning of the pancreatic beta cell for the gluco-incretin hormone glucagons-like peptide-1. Proc Natl Aca Sci USA. 89. 1-5.
- **Tielmans Amélie, Laloi-Michelin Marie, Coupaye Muriel , Virally Marie , Meas Taly , Guillausseau Pierre-Jean ,(2007).**Traitement médicamenteux du diabète de type 2 (première partie).L a presse médicale.23,(2). 269-278.
- **Touchon Jacques, Portet Florence,(2004).** La maladie d'Alzheimer.3^{eme} édition , Edition : Elsevier Masson . 177 p.

(V)

- **Uddin Nizam , Rakib Hasan. Md , Monir Hossain .Md , Sarker Arjyabrata , Nazmul Hasan .A.H.M , Mahmudul Islam. A.F.M , Chowdhury Motaher H, Sohel Rana Md .(2014) .** In vitro α -amylase inhibitory activity and in vivo hypoglycemic effect of methanol extract of Citrus macroptera Montr. Fruit. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 4 ,(6). 473-479.

(V)

- **Vadivel Vellingiri ,Biesalski Hans K,(2011) .**Contribution of phenolic compounds to the antioxidant potential and type II diabetes related enzyme inhibition properties of Pongamia pinnata L. Pierre seeds. Process Biochemistry. 46 . pp: 1973-1980.
- **Vieira Andhira , Druelle Noémie , Courtne Monica , Avolio Fabio , Ben-Othman Nouha , Pfeifer Anja , Gjernes Elisabet, Faurite Biljana, Collombat Patrick ,(2013).** Diabète :approches thérapeutiques émergentes Reprogrammation des cellules pancréatiques en cellules β . Médecine et science.29. 759-55.
- **Virally Marie, Kevorkian Jean-Philippe ,Guillausseau Pierre Jean,(2008).**Incrétines, incréto mimétiques et inhibiteurs de la DPP-4 : homéostasie glucidique et diabète de type 2 . 20, (9). 453-61.

(Z)

- **Zhang Yan , Chian Wong Adeline Ik , Wu Ji'en, Abdul Karim Nura Binte , Huang Dejian, (2016),** Lepisanthes alata (Malay cherry) leaves are potent inhibitors of starch hydrolases due to proanthocyanidins with high degree of polymerization. Journal of Functional Foods. 25 . 568–578.

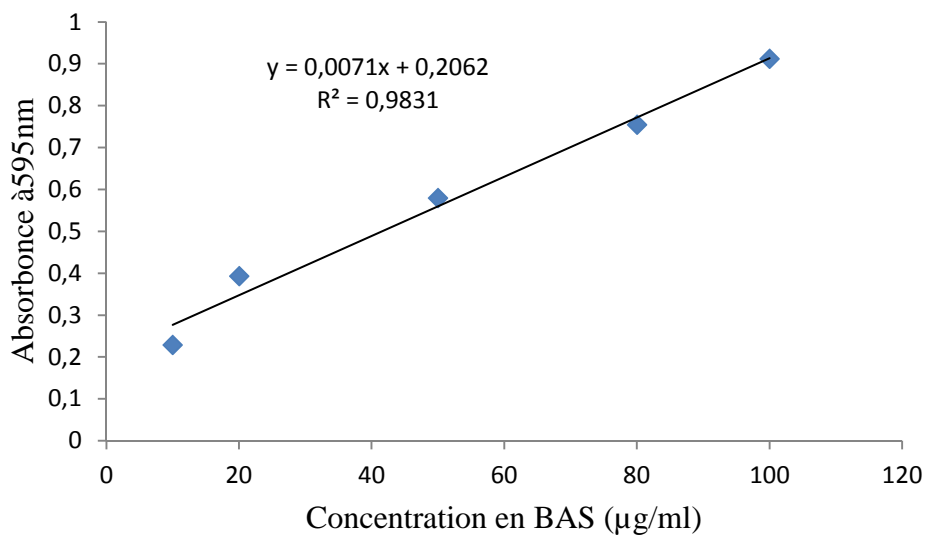
Références numériques

- **anonyme (2001)**
<http://www.didier-pol.net/3ENZYMO.html#ACETYLCHOLINESTERASE>
- **Anonyme (2011)**
<http://www.nouvo.ch/2011/09/alzheimer-le-cerveau-au-centre-du-labo>
- **Anonyme (2015)**
<http://maladiealzheimer.over-blog.com/2015/02/qu-est-ce-que-la-maladie-d-alzheimer.html>
- **Smith Brad, (2009)** . Malting Barley Grain at Home .

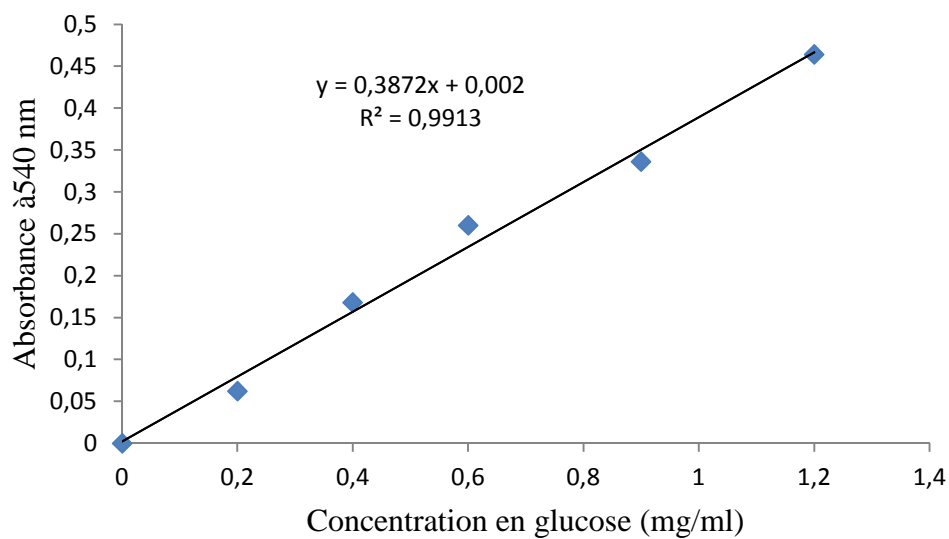
Annexe

Courbes d'étalonnages

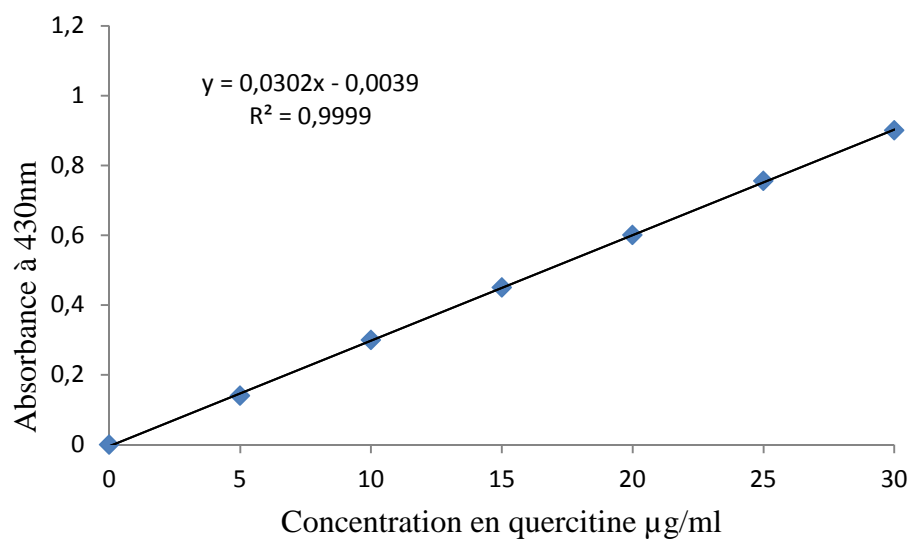
- ❖ **Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par le bleu de Coomassie : gamme de BSA 0-100µg/ml**



- ❖ **Courbe d'étalonnage pour le dosage de glucose par DNS**



❖ La courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes par la quercitrine



Résumé

Dans ce travail, 16 matrices végétales ont été utilisées pour l'extraction à l'éthanol (les Feuilles de *Pistachier*, d'*Arbutus*, de *Ceratonia*, de *Crataegus*, d'*Olea 1*, de *Quercus* et d'*Olea 2*, racine, feuille et tige de *Daphné*; graine et tige de *Tamus* ; tige, racine, feuille et fruit d'*Ecballium*). Les taux des flavonoïdes dans ces extraits éthanoliques varient de 0,38 et 82,68 mg EqQ /g par MS. Aucun des 16 extraits testés n'a d'effet anti-amylase alors que les extraits des feuilles de *Pistachier*, d'*Olea1* et l'extrait de tige de *Daphné* présentent un effet anti-acétylcholinestérase avec des taux d'inhibition de 33% , 66%, 75 % et 56 % et respectivement. L'extrait de feuille du genre *Daphné* présente une teneur en flavonoïde et une activité inhibitrice la plus élevée.

Mots clés : Plantes médicinales, activité anti amylase, activité anti acétylcholinestérase

Abstract

In this work, 16 plant matrices were used for ethanol extraction (*Pistachio*, *Arbutus*, *Ceratonia*, *Crataegus*, *Olea 1*, *Quercus* and *Olea 2* leaves, root and stem of *Daphne*, seed and stem of *Tamus*, root, leaf and fruit of *Ecballium*). The flavonoid levels in these ethanolic extracts ranged from 0.38 to 82.68 mg EqQ / g MS. None of the 16 extracts tested had an anti-amylase effect while extracts from *Pistachio leaf*, *Olea1 Daphne* stem extract has anti-acetylcholinesterase effect with inhibition levels of 33%, 66%, 75% and 56% and respectively. Leaf extract of the genus *Daphné* has the highest flavonoid content and inhibitory activity.

Keywords: Medicinal plants, anti-amylase activity, anti-acetylcholinesterase activity