



.République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMEN

كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون

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

Département de biologie.



MÉMOIRE

Présenté par

BENCHIKH Awatif

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En science alimentaire (nutrition et diététique).

Thème

Effet inhibiteur de l'extrait de *Rubus Ulmifolius* sur l'activité d'alpha amylase.

Soutenu le 24/06/2021, devant le jury composé de :

Président	BELARBI Meriem	professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	SOUALEM Zoubida	M.C.A	Université de Tlemcen
Examineur	CHAOUCH Tarik	M.C.A	Université de Tlemcen

Année universitaire 2020/2021

Remerciement

Je remercie d'abord Allah, le plus puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donné durant toutes ces années.

J'adresse mes plus sincères remerciements à notre encadreur Madame Soualem Zoubida, maître de conférences A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen- pour m'avoir orienté, aidé et pour ses conseils avisés sur l'avancement de mon travail, et aussi pour sa gentillesse.

Je remercie également les membres du jury :

Madame Belarbi Meriem, Professeur à l'université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen-, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Monsieur Chaouch Tarik, Maître de conférences A, à l'université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen- d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je tiens à remercier la doctorante Abbou Faiza, pour son aide, sa gentillesse, ses conseils et surtout sa compréhension.

Je remercie ma famille et mes amies, et toute personne qui m'a aidé de prêt ou de loin à la réalisation de ce travail



Dédicace

Je dédie ce travail aux personnes les plus chères au monde mes chers parents qui m'ont appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour leur sacrifice et leurs encouragements, et de continuer mes études dans les meilleures conditions.

Que Dieu vous bénisse et vous accorde une longue vie.

A mes plus chères : Amine, Djawed, Chakib, Fatima et Hayet.

A mes amies : Fatima, Djihane et Feth EZohor.

A ceux qui ont partagés des moments avec moi et ceux que j'aime.



المخلص .

مرض السكري هو اضطراب شائع معروف بالعصور القديمة يحدث في كل جزء من العالم. يشكل تطوير علاجات جديدة من أصل نباتي خط بحث جديد يعتمد بشكل أساسي على النباتات الطبية التي استخدمها أسلافنا في علاج مرض السكري ومكافحته.

ركز العمل الحالي على الدراسة الكيميائية النباتية والنشاط المثبط لألفا أميليز لمستخلص الأوراق المحضر عن طريق استخراج الارتداد الجزئي من نبات طبي *Rubusulmifolius.L* من عائلة Rosacea. تم استخلاص الأوراق تحت التكتيف الراجع في الهكسان متبوعاً بالميثانول / الأسيتون. ناتج المستخلص 26.74% تم تقدير محتوى البوليفينول الكلي باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu وهو 59.11 مجم GAE / جم DM تم تقييم مركبات الفلافونويد باستخدام طريقة ثلاثي الكلوريد الألومنيوم (AlCl₃) محتوى 19.04 مجم EC / جم DM. تم تقييم العفص باستخدام طريقة الفانيلين ، المحتوى هو 11.11 ملجم / جم DM. ثم قمنا بتقييم تثبيط مستخلصنا ضد ألفا أميليز باستخدام أكاربوز كجزيء مرجعي. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن هناك نشاطاً مثبطاً جيداً لمستخلصات الأوراق على نشاط ألفا اميلاز بقيمة 0.47 مع/ مل والتي تظل أقل من تلك الموجودة في أكاربوز وهي 0.056 مع/ مل.

الكلمات المفتاحي ألفا أميليز, نشاط مضاد لمرض السكر, تحت الجزر, مركبات الفينول,
Rubusulmifolius.L

Résumé :

Le diabète est un trouble fréquent connu depuis l'ancienneté survenant dans chaque partie du monde. Le développement de nouveaux traitements d'origine végétale forme un nouvel axe de recherche qui se base principalement sur les plantes médicinales utilisées par nos ancêtres dans le traitement et le contrôle du diabète.

Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique et l'activité inhibitrice de l'alpha amylase de l'extrait de feuilles préparé par une extraction sous-reflux d'une plante médicinale *Rubus ulmifolius*.L de la famille Rosacée. Les feuilles ont été soumises à une extraction sous reflux dans l'hexane puis méthanol/acétone. Le rendement en extrait est de 26.74%.La teneur totale en polyphénols a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 59.11 mg GAE/g MS. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode de trichlorure d'Aluminium (AlCl₃), sa teneur est de 19.04mg CE/g MS. Les tanins ont été évalués en utilisant la méthode de la vanilline, sa teneur est de 11.11mg CE/g MS. Par la suite nous avons évalué l'inhibition de notre extrait vis-à-vis de l'alpha amylase en utilisant l'Acarbose comme molécule de référence. Les résultats obtenues montrent qu'il ya une bonne activité inhibitrice des extraits des feuilles sur l'activité d'alpha amylase avec une valeur d'IC₅₀ de 0.47 mg/ml et qui reste inferieur a celui de l'Acarbose qui est de 0.056 mg/ml.

Mot Clé : activité anti diabétique, alpha amylase, composé phénolique, *Rubus ulmifolius* L., sous reflux.

Abstract:

Diabetes is a common disorder known for antiquity occurring in every part of the world. The development of new treatments of plant origin forms a new line of research which is based mainly on the medicinal plants used by our ancestors in the treatment and control of diabetes. The present work focused on the phytochemical study and the alpha amylase inhibitory activity of the leaf extract prepared by a sub-reflux extraction of a medicinal plant *Rubus ulmifolius* L of the Rosacea family. The leaves were extracted under reflux in hexane followed by methanol / acetone. The extract yield is 26.74%. The total polyphenol content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, it is 59.11 mg GAE / g DM The flavonoids were evaluated using the trichloride method. Aluminum (AlCl₃), content is 19.04mg EC / g DM. Tannins was evaluated using the vanillin method, the content is 11.11mg CE / g DM. We then evaluated the inhibition of our extract against alpha amylase using Acarbose as a reference molecule. The results obtained show that there is a good inhibitory activity of the extracts of the leaves on alpha amylase activity with an IC₅₀ value of 0.47 mg / ml and which remains lower than that of Acarbose which is 0.056 mg/ml.

Key word: alpha amylase, anti diabetic activity, phenolic compose, *Rubus ulmifolius* L,, under reflux.

Liste des figures :

Figure 1 : les complications du diabète (FID, 2006).

Figure 2 : Répartition mondiale du diabète (FID, 2015).

Figure 3 : Structure tridimensionnelle de l'alpha amylase (Kraulis, 1991).

Figure 4 : Structure et site catalique de l'alpha amylase (PDB, 2006).

Figure 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Figures 6 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Figures 7 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

Figure 8 : taux d'inhibition de l'extrait sur l'alpha amylase

Figure 9 : Effet inhibiteur de l'acarbose sur α -amylase (contrôle positif).

Liste des abréviations :

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

DID : Diabète InsulinoDépendant.

DNID : Diabète Non InsulinoDépendant.

FID : Fédération International de Diabète.

ADA : American Diabetes Association.

HDL : High Density Lipoprotéine.

LDL : Low Density Lipoprotéine.

HGPO : Hyperglycémie Provoqué par voie Orale.

ADO : Anti Diabétiques Oraux.

ROS : Les dérivés Réactifs de L'Oxygène.

PDB : Protein Data Bank.

CNGOF : Collège National des Gynécologue et Obstétriciens Français.

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Résultats des quelques études ethnobotanique sur les plantes antidiabétiques dans le monde (Azzi, 2007).

Tableau 2 : Systématique de *Rubus ulmifolius* (Boukef, 1986).

Tableau 3: Quelques propriétés des alpha-amylases (Khacheba, 2008).

Table de matière

Remerciement

Dédicace

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

الملخص

Résumé

Abstract

Introduction générale -----01

Partie I : synthèse bibliographique.

Chapitre 1 : Le diabète

1. Historique-----	03
2. Définition.....	03
3. Facteurs de risques de diabète.....	04
4. Les complications de la maladie.....	04
5. Epidémiologie	05
5.1. Le diabète dans le monde.....	05
5.2. Le diabète en Algérie.....	06
6. Classification	06
6.1. Diabète type 1.....	07
6.2. Diabète type 2.....	07
6.3. Diabète gestationnel.....	08
7. Traitement de diabète	08
7.1. Traitement médicamenteux	08
7.2. Phytothérapie.....	09

7.2.1.	Définition.....	09
7.2.2.	Plante anti diabétiques.....	09
7.2.2.1.	Dans le monde	09
7.2.2.2.	En Algérie.....	10
7.2.2.3.	Principe actifs des plantes médicinales	10

Chapitre 2 : Rubus Ulmifolius.L

1.	Généralité sur la plante.....	14
1.1.	La famille des rosacées.....	14
1.2.	Le genre Rubus	14
1.3.	<i>Rubus Ulmifoliusschott</i>	14
2.	Utilisation thérapeutique.....	16

Chapitre 3 : Alpha amylase

1.	Alpha amylase.....	18
1.1.	Définition	18
1.2.	Origines.....	18
2.	Caractéristique de l'alpha amylase.....	19
2.1.	Poids moléculaire.....	19
2.2.	Le Ph optimum.....	20
2.3.	Température optimum	20
2.4.	Effecteur	20
3.	Nomenclature d'alpha amylase	20
4.	Structure d'alpha amylase.....	21
5.	Mécanisme d'action	22
6.	Métabolisme des hydrates de carbonés.....	23
7.	Inhibition d'alpha amylase.....	23

Partie II : Expérimentale

Matériel et méthode

1.	Objectifs.....	25
2.	Matériel végétal	25
3.	Préparation d'extrait	25
4.	Quantification de quelques classes phénolique dans l'extrait.....	25
4.1.	Les polyphénols totaux	26

4.2. Les flavonoïdes totaux	26
4.3. Les tanins condensés	27
5. Estimation des activités inhibitrice d'alpha amylase, in vitro.....	27
5.1. La présence des réactifs	27
5.2. Mode opératoire.....	28

Résultats et discussion

Etude phytochimique	30
1. Rendement de l'extrait brut	30
2. Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins.....	30
2.1. Les polyphénols totaux.....	30
2.2. Les flavonoïdes totaux	31
2.3. Les tanins.....	32
3. Effet inhibiteur des extraits de <i>Rubus Ulmifolius</i> sur l'activité d'alpha amylase porcine in vitro	32

Conclusion	36
-------------------------	-----------

Références bibliographiques.....	38
---	-----------

Annexes

Introduction générale.

Le diabète, est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas l'insuline correctement. L'insuline c'est une hormone clé qui régule le taux de sucre dans le sang (**OMS, 2016**).

Cette maladie est associée, à des complications à long terme, qui touchent en particulier les yeux, les nerfs, les reins, les vaisseaux sanguins et le cœur (**ADA, 2008 ; Rodier, 2008**).

Les diabétiques doivent contrôler leur glycémie à l'aide de médicaments ou d'un programme d'exercices (**Kandra, 2003**). Parmi les enzymes du tube digestif, l' α -amylase pancréatique (EC 3.2.1.1), qui digère les glucides en glucose comme elle a un rôle dans la décomposition des composants complexes des glucides en monosaccharides, parce qu'elles sont les seuls qui peuvent être absorbés par la lumière intestinale et transportés dans la circulation sanguine (**Dewi, 2007**). Donc l'alpha amylase est considéré comme un traitement thérapeutique pour les diabétiques grâce à son inhibition de la digestion du glucose qui réduit le taux de glucose sanguin.

La médecine traditionnelle qui se base sur les extraits naturels de plantes médicinales offrant un grand potentiel de découverte de nouveaux médicaments antidiabétiques. Plusieurs plantes ont montré une activité inhibitrice de l' α -amylase et pourraient être utiles au traitement du diabète (**Ventes, 2012**).

*Rubusulmifolius*Schott est un arbuste qui appartient à la famille des Rosacées qui pousse dans un sol sec ou sablonneux. Elle a été cultivée en Afrique du Nord et en Europe (**Fazio et al, 2013**).Elle a été utilisée par la médecine traditionnelle italienne pour traiter plusieurs maladies comme les troubles vaginaux, inflammation intestinale et abcès (**Ali et al, 2017**).

L'objectif de ce travail est de faire l'évaluation de la composition chimique en composé phénolique de l'extrait des feuilles de *RubusUlmifolius*.et évaluer l'activité inhibitrice de l'extrait des polyphénols de l'alpha amylase en utilisant l'Acarbose comme référence.

Le travail est structuré en trois chapitres :

La première partie c'est une synthèse bibliographique qui comporte une généralité sur le diabète, la plante étudiée *Rubusulmifolius* et l'alpha amylase.

la deuxième partie illustre le travail expérimental, le matériel et méthodes que j'ai utilisé pour l'analyse physico-chimique et l'activité anti diabétique.

Et pour la dernière partie nous avons présenté les résultats obtenus et la discussion. J'ai conclu mon travail avec une conclusion finale et les perspectives de ce travail.

Chapitre 1: le diabète

1. Historique :

Le diabète est un trouble fréquent connu depuis l'ancienneté survenant dans chaque partie du monde.

C'est 4000 ans avant J.C. en Chine que le diabète a été mentionné pour la première fois.

La première description clinique précise est donnée dans les écrits d'Arete de Cappadoce (170 avant JC) qui décrit « cette mystérieuse affection ... par laquelle se consomment la chair et les jambes dans l'urine (**Bloom et Ireland, 1981**).

Le terme « diabète » signifie passer au travers et vient du grec ancien en référence à deux symptômes caractéristiques de la maladie, la soif et le besoin fréquent d'uriner. Le terme latin « mellitus » signifiant sucre a été ajouté par le médecin anglais Thomas Willis après avoir noté le goût sucré des urines de patients diabétiques (**Willis, 1674**). 275 ans avant J.C. le terme « diabète », signifiant « qui passe à travers ». Cette maladie ne fut décrite et étudiée qu'au premier siècle après J.-C. (**Delluc et al, 2003**). Le diabète est une maladie encore mal connue étant donné son étiologie complexe. Le diabète est devenu la 4ème ou la 5ème cause de mortalité dans la plupart des pays développés selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et sa progression est fulgurante dans les pays en voie de développement et notamment en Afrique.

2. Définition :

Le diabète touche plus de 420 millions de personnes dans le monde. Selon l'OMS, cette maladie pourrait passer de la 8e à la 7e cause de décès dans le monde en 2030. Il est diagnostiqué avec au minimum 5 années de retard (**OMS, 2016**).

Le diabète est un ensemble d'étiologies diverses et de maladies métaboliques, et c'est un trouble d'utilisation, de stockage et de l'assimilation des sucres apportés par l'alimentation, caractérisé par une élévation de taux de glucose dans le sang (hyperglycémie) chronique, accompagnée par une perturbation des métabolismes glucidique, protéique et lipidique, résultant d'un trouble de sécrétion et/ou d'action de l'insuline (**DeFronzo et al., 2015**). Cette hyperglycémie chronique est associée, à des complications à long terme, touchant en particulier les yeux, les nerfs, les reins, les vaisseaux sanguins et le cœur (**ADA, 2008 ; Rodier, 2008**). On parle d'hyperglycémie, soit quand on a une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L (7 mmol/L) ou une glycémie supérieure à 2 g/L (11,1 mmol/L) à n'importe quel moment ou lors d'une hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) à deux reprises (deux heures après le début d'un repas ou après ingestion de glucose orale de 75 g).

3. Facteurs de risques de diabète :

Loin de diabète, on a plusieurs situations physiopathologiques qui sont traditionnellement considérées comme étant à risque de développer une pathologie cardiovasculaire.

Connaitre les facteurs de risque du diabète permet d'éviter l'apparition de la maladie.

On répartit ces facteurs de risques en deux catégories : **(Diabètes Care, 2011)**.

- Les facteurs de risques modifiables : le sexe et l'âge.
- Les facteurs de risques non modifiables : ils sont obligés d'avoir une prise en charge thérapeutique :
 - Le surpoids.
 - La dyslipidémie (hypercholestérolémie (LDL) et une hypocholestérolémie (HDL)).
 - Le tabagisme.
 - L'hypertension artérielle.
 - La sédentarité.
 - une alimentation trop riche en graisses et en sucres.

4. Les complications de la maladie :

Les complications de diabète sont liées à plusieurs facteurs (environnement, disponibilité des moyens de traitement, profil des patients, parcours de soins) **(Belhadj et al, 2016)**.

- Les complications métaboliques aiguës : qui sont causés par des accidents hypoglycémiques et trois complications hyper glycémiqes du diabète : syndrome d'hyperglycémie hyperosmolaire, acidocétose diabétique et acidose lactique **(Orban et Ichai, 2008)**.
- Et les complications chroniques : qui consistent en une déformation de la structure et des fonctions des micro-vaisseaux (micro angiopathie), et des macro-vaisseaux (macro angiopathie). La micro angiopathie est en cause dans la néphropathie, la neuropathie diabétique et la rétinopathie. Alors que la macro angiopathie est responsable d'ischémie des membres inférieurs, d'accidents cardiovasculaires, et vasculaires cérébraux **(Baron, 2002)**.



Figure 01 : Les complications du diabète (FID., 2006)

5. Epidémiologie :

5.1. le diabète dans le monde :

Selon FID et l’OMS, l’épidémie mondiale du diabète a touché 422 millions de personnes en 2014.

La prévalence mondiale du diabète a doublé depuis 1980 (de 4.7% à 8.5% chez la population adulte).

Le diabète a fait 1,5 million de morts en 2012. Une glycémie supérieure à la normale a été la cause de 2,2 millions de décès supplémentaires augmente les risque des maladies cardiovasculaires et d’autres maladies. Un grand nombre de ces décès (43%) surviennent avant l’âge de 70 ans (OMS, 2016).

Après l’âge de 50 ans, les pays à revenu intermédiaire ont la plus forte proportion de décès causé par l’hyperglycémie chez les hommes et chez les femmes, par contre dans les pays à revenu élevé, la proportion de décès responsable de l’hyperglycémie chez les femmes et chez les hommes est plus élevée dans la classe d’âge de 60 à 69 ans (OMS, 2016).

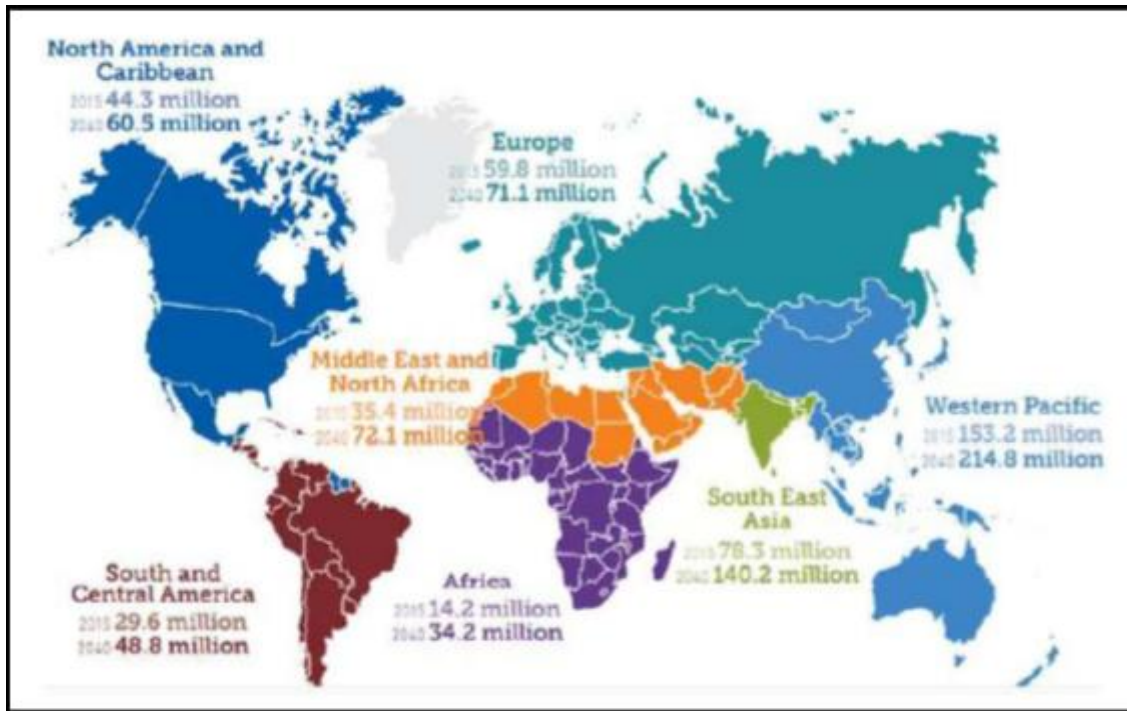


Figure 02 : Répartition mondiale du diabète (FID, 2015).

5.2. Le diabète en Algérie :

Le diabète pose un vrai problème de santé publique en Algérie.

Les complications chroniques dominées par les complications cardiovasculaires, le pied diabétique, l'insuffisance rénale chronique et la rétinopathie (Belhadj et al, 2005).

Une étude fait dans l'ouest algérien entre 1989 et 1993, montre que seul le pied diabétique représente 10 % des hospitalisations, avec une mortalité de 9,1 % (Malek et al, 2001).

La répartition des causes de décès selon une enquête par interview, réalisée en 1990 par l'institut national de santé publique (INSP), montre que, le diabète est parmi les dix premières causes de décès, il occupe la 4e place dans les maladies non transmissibles avec une prévalence de 0,54% (Malek, 2008).

6. Classification :

La dernière classification des diabètes distingue le diabète de type 1 (insulinodépendant), de type 2 (non insulinodépendants) et le diabète gestationnel.

Il peut être difficile dans certains cas de faire la différence entre le diabète de type 1 et de diabète de type 2 au moment du diagnostic.

Cette différence est importante, car leurs stratégies de prise en charge sont différentes. Les signes physiques d'une insulino-résistance et les marqueurs auto-immuns comme les auto-anticorps anti-îlots de Langerhans et anti glutamate décarboxylase peuvent s'avérer utiles, mais leur utilisation pour test diagnostique n'a pas fait l'objet d'études adéquates (ADA, 2012).

6.1. Diabète type 1 :

Le diabète de type 1 appelé le diabète insulino-dépendant (DID) mais aussi appelé juvénile. Il touche environ 6% des diabétiques, se caractérise par une production insuffisante d'insuline, il résulte la destruction de la cellule bêta des îlots de Langerhans du pancréas et prédispose à l'acidocétose. Lors de la destruction du 80% des cellules bêta, ils en résultent un état d'insulinopénie et d'élévation de la glycémie. On atteint une expression clinique c'est le pré diabète. Certains diabète de type 1, avec l'absence des marqueurs, sont considérés comme : idiopathiques. Parmi eux, il existe le diabète à installation remarquable, dont le mode de présentation se caractérise par des anomalies cliniques et biologiques et par l'absence d'insuline. Les données expérimentales et celles des observations cliniques, s'accorde que cette maladie est une pathologie auto-immune **(Martin, 2000)**.

Les symptômes du diabète de type 1 selon l'OMS, sont les suivants :

- . Excrétion excessive d'urine (polyurie).
- . Sensation de soif (polydipsie).
- . Faim constante.
- . Perte de poids.
- . Altération de la vision.
- . Fatigue.

6.2. Diabète type 2 :

Le diabète de type 2 appelé diabète non insulino-dépendant (DNID) ou diabète de la maturité, C'est une maladie hétérogène, non auto-immune, qui résulte une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. Et elle représente 80 à 90% des diabètes. Il est en grande partie la conséquence d'une surcharge pondérale et du manque d'activité physique. Dans le type 2, il existe une production endogène d'insuline suffisante pour éviter l'acidose, contrairement au type 1 **(Martin, 2000)**.

Le diabète type 1 et type 2, ont des symptômes similaires, mais sont souvent moins marqués. Pour cela, la maladie peut être diagnostiquée plusieurs années après son apparition, une fois les complications déjà présentes. Ces dernières années, on observe ce type que chez l'adulte, mais il survient désormais de plus en plus même chez l'enfant **(OMS, 2016)**.

6.3. Diabète gestationnel :

Le diabète gestationnel, appelé aussi "diabète de grossesse", est un trouble de la tolérance glucidique qui provoquant une hyperglycémie de sévérité variable, diagnostiqué pour la 1^{ère} fois au cours de la grossesse (**CNGOF, 2010**).

Selon l'OMS, On regroupe deux populations différentes :

- les femmes qui ont un diabète pré- existants mais méconnu pendant la grossesse par une glycémie élevée à jeun.
- les femmes qui développent un diabète uniquement à l'occasion de la grossesse, trouble qui disparaît le plus souvent après l'accouchement.

Le diabète gestationnel nécessite une prise en charge stricte car il comporte un risque pour la mère :

- Accouchement par césarienne.
- risque de développer un diabète de type 2 après la grossesse (7 fois plus que sans diabète gestationnel).
- accouchement prématuré.

Comme pour l'enfant :

- Détresse respiratoire.
- hypoglycémie néonatale.
- risque de développer plus tard un diabète de type 2.

Il peut être un diabète sans symptômes, comme il peut avoir les mêmes symptômes que les autres diabètes (soif intense, urines fréquentes et abondantes, fatigue importante...).

7. Traitement du diabète :

Il y a deux types de traitements du diabète, les non médicamenteux (traitement hygiéno-diététiques) et les médicamenteux (antidiabétiques oraux (ADO) et insulinothérapie).

7.1. Traitement médicamenteux :

Afin d'obtenir une glycémie normale et régulée, l'insuline est le moyen le plus efficace pour le traitement des diabétiques de type 1 (**Kelley et al, 1990 ; Bailey, 1999**). Et concernant les diabétiques de type 2, il y a le traitement pharmacologique actuel qui se repose sur:

- L'utilisation des Insulinosécréteurs tels que les sulfamides hypoglycémiants (sulfonylurées) et les glinides qui stimulent le pancréas à sécréter l'insuline.
- La diminution de la néoglucogénèse hépatique en s'aidant de la metformine (les biguanides normoglycémiants).

- Diminution de l'insulinorésistance par les glitazones (thiazolidinediones) ou la metformine.
- L'empêchement de la digestion de glucides (tels que l'amidon et sucre de table) par les inhibiteurs des alphaglucosidases (Acarbose) (**Inzucchi, 2002 ; Henquin, 2005**).

7.2. Phytothérapie :

7.2.1 Définition : Le mot phytothérapie se compose de deux mots (Phyton= végétal et Therapein= soigner) qui veut dire « soigner avec les plantes ». Et la phytothérapie c'est la médecine qui se base sur les extraits des plantes et les principes actifs naturels. On distingue trois types de pratiques :

- Une pratique traditionnelle : c'est une pratique qui se base sur l'utilisation des plantes. Selon l'OMS, la phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique.

-Une pratique basée sur les preuves scientifiques qui recherchent des extraits actifs dans les plantes. Cette pratique est basée sur la fabrication des médicaments pharmaceutiques ou des phytomédicaments, on parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique.

-Une pratique de prophylaxie : Nous sommes tous phytothérapeutes sans le savoir : c'est le cas dans la cuisine, avec l'utilisation de la ciboulette, de thym, de l'ail, du gingembre et du thé vert. Une alimentation équilibrée et composer de certains éléments actifs étant une phytothérapie prophylactique (**Sebai et Boudali, 2012**).

7.2.2. Plante anti diabétique :

7.2.2.1. Dans le monde :

L'étude ethnobotanique des plantes utilisées comme traitement de diabète a suscité un grand intérêt. Plusieurs travaux de synthèse ont été publiés dans des revues spécialisées dans le domaine des plantes médicinales et diabète dans le monde (**Bailey et Day, 1989 ; Marles et Farnsworth, 1995 ; Eddouks et al, 2007 ; Ivorra et al, 1989 ; Rahman et Zaman, 1989 ; Roman-Ramos et al, 1992 ; Grover et al, 2002 ; Soumayanth, 2006**).

Plus de 1200 plantes ont été analysées comme traitement antidiabétiques, mais seulement quelques-unes ont été classifiées scientifiquement (**Bailey et Day, 1989 ; Ivorra et al, 1989 ; Wang et Ng, 1999 ; Li et al, 2004**). Ces plantes représentent 725 genres et 183 familles. Et 81% de ces plantes testées sur les animaux montrent une diminution de l'hyperglycémie (**Marles et Farnsworth, 1996**).

Le tableau résume quelques études ethnobotaniques sur les plantes antidiabétiques dans le monde.

Tableau 01 : Résultats de quelques études ethnobotaniques sur les plantes antidiabétiques dans le monde (Azzi, 2007).

Pays (région)	Nombre d'espèces	Références
Algérie (région de Tlemcen)	80	(Benmehdi, 2000)
Maroc	41	(Ziyyat et al., 1997)
Inde	800	(Grover et al., 2002)
Chine	20	(Dharmananda, 2003)
Canada (Québec)	18 espèces pour 9 familles	(Leduc et al., 2006)
Afrique du Sud (région d'Eastem Cap Province)	14 espèces pour 6 familles	(Erasto et al., 2005)
Le monde entier	389	(Padavala et al., 2006)

7.2.2.2. En Algérie :

L'Algérie, grâce à sa situation géographique, et son climat diversifié, les plantes poussent en abondance dans les régions côtières, sahariennes et également des régions montagneuses. Ces plantes peuvent être utilisées en traitement curatif et préventif à l'aide des remèdes naturels potentiels (Mahmoudi, 1987).

Le patrimoine végétal en Algérie occupe une grande importance dans le traitement du diabète et la pharmacopée traditionnelle, dont plusieurs enquêtes ethnobotaniques travaillent dans le but de classer ces plantes dans l'Est Algérien (Hamza, 2011) et aussi dans l'Ouest Algérien (Allali et al, 2008).

Parmi ces plantes: *Ficus carica*, *Citrulluscolocynthis L*, *Ajugaiva L*, *Marrubiumvulgare*, *Centauriumerythraea*, *Cuminucyminum*.

7.2.3. Principes actifs des plantes médicinales :

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde contient des vertus thérapeutiques parce qu'elles contiennent des principes actifs qui agissent sur l'organisme directement, et on les utilise aussi en médecine classique (Ticli, 1997).

Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires, dont 200 métabolites présentent une activité hypoglycémiant (Marles et Farnsworth, 1995 ; Lamba et al, 2000 ; Sanjay, 2002).

Un certains nombres de groupes, tels que des alcaloïdes, des flavonoïdes, des acides

aminés et d'autres obtenus à partir des sources végétales, avoir des effets dans le traitement du diabète (**Mukherjee et al, 2006 ; Soumyanath, 2006**).

- **Polyphénols :**

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans les plantes vasculaires (**Lebham, 2005**), ils ont une propriété antidiabétique. Plusieurs études expérimentales ont mis en évidence des activités hypoglycémiantes de certains polyphénols (**Gray et Flatt, 1997**).

Après un test de tolérance au glucose ou après la consommation d'un régime riche en maltose, l'acide 4-hydrox benzoïque, les anthocyanes et aussi un extrait de thé vert diminuent le pic de glycémie, ils ont étudié cette méthode chez les rats (**Peungvicha et al, 1998 ; Sabu et al, 2002**). On explique ça par une inhibition de glucosidase ou de transporteurs de glucose au niveau de la barrière intestinale qui limiterait ainsi l'absorption intestinale du glucose.

Certains polyphénols pourraient avoir une action sur la glycémie en modifiant la réabsorption rénale du glucose (**Dimitrakoudis et al, 1992**).

Deux essais cliniques ont été réalisés, le premier sur des sujets atteints d'un diabète de type 2 recevant par voie orale un complexe d'extrait d'orange rouge (50 mg/j) pendant 2 mois (**Bonina et al, 2002**), et le deuxième fait sur des patients diabétiques de type 1 recevant un extrait enrichi en flavonoïdes et hespéridine (**Manuel et al, 1999**).

Les résultats de ces deux études montrent que un régime riche en différentes classes de polyphénols n'affecte pas la glycémie des patients diabétiques (**Van dam et Feskens, 2002 ; Fiorucci et al, 2006**).

- **Flavonoïdes :**

Ils sont des pigments poly phénoliques, qui aide à colorer les fleurs et les fruits en jaune et en blanc et qu'on les trouve dans la plupart des plantes.

Les flavonoïdes peuvent arrêter le diabète ou le diminuer en bloquant l'enzyme aldose réductase. La myricétine est un composé organique qui possède un effet hypoglycémiant chez les animaux diabétiques (**Das et al, 1994**). Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), par inhibition de certaines enzymes responsables de la production des ROS et par chélation de métaux de transition (**Formica et Regelson, 1995**). Certains flavonoïdes augmentent la sécrétion d'insuline à partir des îlots de Langerhans isolés de rats.

La quercétine est un composé organique qui diminue également les taux de glucose chez des rats diabétiques en réponse à un test de tolérance au glucose. Elle diminue le

cholestérol et les triglycérides plasmatiques, et augmente l'activité des glucokinases hépatiques probablement par l'augmentation de la sécrétion d'insuline, à partir des îlots pancréatiques des rats diabétiques (**Kim et al, 2004**).

- **Tanins :**

Les tanins sont un mélange de glucosides et d'acide gallique. On les trouve dans de très nombreuses plantes en petite quantité (**Ticli, 1997**).

Ce sont des substances phénoliques complexes, elles sont également bactéricides, astringentes, et cytostatiques (**Verdrager, 1978**). On distingue deux groupes: les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables (ou tanins condensés).

Chapitre 2 :

Rubus Ulmifolius.L

1. Généralité sur la plante :

1.1. La famille des rosacées :

La rosacée est l'une des familles des plantes les plus importantes sur le plan économique dans les régions équilibrées et comprend plus de 100 genres et environ 3000 espèces. Les composés phytochimiques et les composés phénoliques présents dans les fruits des rosacées, et ils sont des sources majeures de nutrition humaine qui pourraient éventuellement favoriser la santé et avoir des avantages contre les maladies (Akhtar et al, 2017).

1.2. le genre *Rubus* :

Le genre *Rubus* comprend les mûres, les framboises et leurs hybrides et il est appelé ronces, il peut se découper en trois sous-genres suivants :

- les framboises avec leurs fruits rouges, enrobé de nombreux poils courts, appelé « sous-genre *Idaeobatus* ».
- le deuxième, c'est le petit *Rubus* qui donne des fruits rouges vifs avec peu de drupéoles (petites boules qui forment le fruit) toutes glabres qui forme à lui seul le « sous-genre *Cylactis* ».
- Et le dernier, on a le sous-genre des ronces qui donnent comme fruit ce que nous appelons les mûres, c'est le « sous-genre *Rubus* » (Folta et Gardiner, 2009; Hummer, 2010).

1.3. *Rubus Ulmifolius* Schott :

- Les noms scientifiques synonymes : (Evans et al, 2007)

On a plusieurs noms synonymes qu'ils sont attribués à la plante :

Rubus rysticanus.

Rubus ulmifolius var. *inermis*

Rubus ulmifolius var. *ulmifolius*

Rubus ulmifolius var. *anoplothyrus*

- Description :

Rubus ulmifolius est une espèce arbustive sarmenteuse formant des fourrés épineux fermés. Le développement des tiges de ce dernier est biennuel. Seules les tiges de la deuxième année donnent au cours de l'été les inflorescences, produisant après le fruit composé de segments charnus comportant tous une graine (Masson et al, 2014).

C'est une plante très variable généralement robuste, hautement arquée pouvant structurer des ronciers étendus et denses.

Feuilles : la plupart à 5 folioles (très rarement à 4 ou 3 folioles), et ils sont généralement soit pédalées ou digitées (**Ferrez et al, 2015**). Sépales réfléchis, gris-blanc courtement tomenteux, sans acicule. Les pétales sont de couleur rose-rouge violacé rarement rose pâle ou blanche.

Fleurs : De couleurs roses souvent profond, et des styles, rougeâtres au moins à la base, sont également diagnostiqués (**Ferrez et al, 2019**).

- **Nom vernaculaire :**

Nom vernaculaire algérien : Âlaieg (**Ounaissiaet al, 2019**)

Nom français : La ronce (**Lazli et al, 2019**)

- **Systématiques :**

Tableau 02: Systématique de *Rubusulmifolius* (**Boukef, 1986**).

Rubusulmifolius Schott, fait partie de la famille des rosacées.

Règne	Plante
Sous règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophyta
Sous embranchement	Angiospermathophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Rosidae
Ordre	Rosales
Famille	Rosaceae
Genre	Rubus
Espèce	<i>Rubusulmifolius</i>

- **Composition de *RubusUlmifolius* :**

Rubusulmifolius contient des acides phénoliques et des flavonoïdes. Les principaux composés de ce dernier sont l'acide caféique, l'acide férulique, la quercétine-3- O-glucuronide, le kaempférol-3-O-β-D-glucuronide, l'acide gallique, et le tiliroside (**Panizzi et al, 2002**), et aussi l'acide ellagique (**Martini et al, 2009**). Et en plus, il contient des acides organiques, de l'acide ascorbique, des tanins et des huiles volatiles (**Wada et Ou, 2002**). Le

kaempférol 3-O-rutinoside et la naringénine sont des composés phénoliques dominants dans les feuilles de *R. ulmifolius* (**Tabarki et al, 2017**).

2. Utilisation thérapeutique :

Rubus ulmifolius a été utilisé par les médecines traditionnelles italiennes, pour le traitement des ulcères, abcès, furoncles, yeux rouges, troubles vaginaux, inflammations intestinales, diarrhée et hémorroïdes. *Rubus ulmifolius* est utilisé pour leur activité hypoglycémique et pour l'activité antipyrétique (**Ali et al, 2017**). Les feuilles de ronce sont très astringentes et peuvent être employées pour traiter aussi les aphtes, fortifier les gencives. On l'utilisées pour la toux, les maux de gorge et les affections buccales comme tisane ou en gargarisme, et en infusion pour leucorrhées, diabète, hémorragies et lithiase. Et pour traiter les aphtes gingivites, pharyngites et les plaies en application externe (**Souilah, 2018**).

Chapitre 3 : alpha amylase.

1. Alpha amylase :

1.1. Définition :

L'alpha amylase pancréatique (E.C. 3.2.1.1) est découvert en 1833 par les français Anselme Payen et Jean-François Persoz. C'est une enzyme clé dans le système digestif et elle représente Environ 5 à 6% des protéines totale dans les sécrétions pancréatiques (**Whitcomb et Lowe, 2007**). Elle appartient à la famille des hydrolases (**Mercier, 1985 ; Keating et al, 1998**), et elle est présente dans le pancréas et la salive. Alpha amylase appelée aussi diastase ou takadistase en se basant sur le mot grec (séparer). L'amylase salivaire est une 1,4- α -d-glucane glucanohydrolase comme l'amylase pancréatique (**Karn, 1978**). La différence de la séquence d'acides aminés de l'enzyme salivaire et pancréatique est de 6% (**Abrams et al, 1987**).

1.2. Origines :

Les règnes (bactérienne, fongique, animale et végétale) est fortes d'alpha amylase, et les différentes origines n'altèrent en aucun cas l'activité amylolytique.

Son isolation a été faite par extraction des tissus végétaux et animaux ou par fermentation par des cellules microbiennes (**Nouadri, 2011**).

- Origine animale :

L'alpha amylase d'origine animale est extraite généralement du pancréas des mammifères tels que les porcs et les veaux et aussi de la salive humaine (**Chatterton et al, 1996**).

Chez les êtres humains, l'enzyme est présente dans les sécrétions salivaires et pancréatiques (**Coolbear et al, 1992**).

Les dextrines sont les produits qui résultent de la digestion par α -amylase. Et c'est un mélange de maltotriose, maltose et oligosaccharides ramifiés de 6 à 8 unités de glucose contenant les liaisons α -1,4 et α -1,6.

Ensuite les dextrines sont digérées par les enzymes de la bordure en brosse intestinale (maltase et isomaltase) (**Alpers, 1994**).

- Origine végétale :

L' α -amylase d'origine végétale a un rôle fondamental dans le métabolisme des glucides, parce qu'elles participent à la conversion de l'amidon (le réduisant en sucres réducteurs) (Nouadri, 2011).

Ces enzymes végétales sont obtenues par l'extraction des céréales et notamment l'orge, le blé, le son ou le riz (Srinivasa et al, 2004).

Elles sont formées généralement au cours de la germination des grains.

- Origine microbienne :

On distingue 2 types (l' α amylases fongiques et l' α amylases bactérienne).

- **Alpha amylase fongique :** Les α -amylases d'origine fongiques sont différentes des alpha-amylases bactériennes, et cela par une inactivation par la température, un pH optimal faible (4-5) et un pouvoir élevé de saccharification (Costes, 1982).
- **Alpha amylase bactérienne :** Obtenu par la fermentation de Bacillacées. Ce type d'enzyme est exo-cellulaire, en histoire c'est la première enzyme qui a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* ou *B. subtilis* fermentant en surface (Mctigue et al, 1995).

Tableau 04: Quelques propriétés des α -amylases (Khacheba, 2008).

Enzyme d'origine	Exemple	PH optimale	Température optimale (°C)
Animale	Salive humaine	6,9	40
	Pancréas de porc	6,9	37
végétale	Malte d'orge	4,7-5,4	50-55
	Blé	4,6	60-66
Microbienne	<i>Bacillus coagulans</i>	5,2	57
	<i>Aspergillus oryzae</i>	5,5-6,9	40

2. Caractéristique de l'alpha amylase :

2.1. Poids moléculaire :

Le poids moléculaire des alpha-amylases varie d'une origine à une autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40.000 et 90.000 daltons (Schomburg et Salzmann, 1991).

2.2. Le PH optimum :

L'enzyme est habituellement stable dans une gamme de pH de 5 à 8, pour les α -amylases fongiques l'optimum se situant entre 4 à 5, et pour les α -amylases bactériennes, un optimum supérieur à la neutralité 6 à 8.5 pour les α -amylases bactériennes (**Ait Kaki-El-Hadef et al, 2012**).

Pour les levures, l'enzyme requiert des pH entre 4 à 6 selon les espèces (**Panchal, 1990**).

2.3. Température optimum :

Les températures optimales des alpha-amylases comprises entre 40°C et 90°C et cela diffère selon l'origine et les espèces (**Schomburg et Salzmann, 1991**).

Par exemple, Les amylases microbiennes, ont une forte thermo stabilité (30-60°C) et leur température optimale se situant entre 40°C et 70°C (**Park et al, 1997**).

l'alpha amylase bactérienne est réputée pour sa grande thermo-stabilité, celle de *Bacillus amyloliquefaciens* est caractérisée par un optimum de température élevée qui va de 70°C à 90°C , alors que l'alpha amylase fongique est d'une thermo-stabilité assez faible, son optimum comprise entre 50°C et 55°C (**Nouadri, 2011**).

L'amylase levurienne a des optimums de température, allant de 40°C à 60°C et parfois même 70°C pour certaines espèces comme *Lipomyces starkeyi* (**Panchal, 1990**).

2.4. Effecteur :

Toutes les enzymes alpha amylases, pour le maintien de leur stabilité structurale et intégrité, nécessite la liaison d'au moins un ion calcium (**Vallee et al, 1959 ; Steer et Levitzki, 1973**).pourtant, à une concentration supérieure à 20mM, le calcium devient inhibiteur (**Boel et al, 1990**).

3. Nomenclature d'alpha amylase :

- Nomenclature codifié : EC 3.2.1.1
- Nomenclature commune : alpha –amylase
- Autres appellation (s): maxilase, glycogénase, endoamylase; Taka-amylase A.

- Nomenclature systématique: 1,4- α -D-glucane-4-glucanohydrolase (Schamburg et Slzmann, 1991 ; Dauter et al, 1999).

4. Structure d'alpha amylase :

L'alpha-amylase est une glycoprotéine, composée de trois domaines globulaires (A, B et C) (Farber et Petsko, 1990). L'enzyme renferme une partie glucidique qui est formée principalement, de D-glucose, D-mannose, D-xylose, D-galactose et D-glucosamine (Stefanova et Emanuilova, 1992), reliée à la chaîne polypeptidique composée de 471 à 483 résidus d'acides aminés, avec 4 ou 5 ponts disulfure (Heslot, 1996).

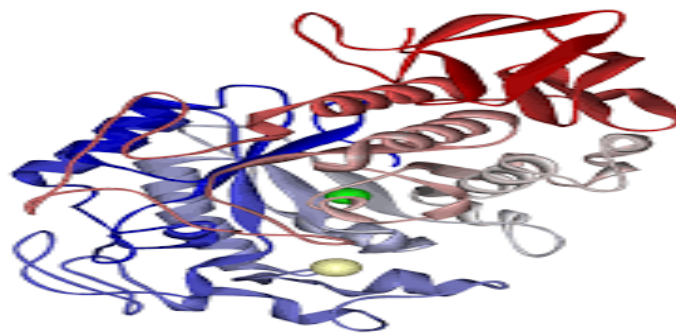


Figure 03 : Structure tridimensionnelle de l' α -amylase (Kraulis, 1991).

Domaine A de couleur gris et rose, domaine B de couleur bleu, domaine C de couleur rouge. L'ion de calcium (sphère jaune) et l'ion de chlorure (sphère verte).

- Le domaine A, le plus grand, forme un tonneau (β/α) qui contient 8 hélices α et de 8 feuillets β plissés et ils se disposent de façon parallèle, à la partie C-terminale des feuillets β se trouve le site actif et le site de liaison de l'ion chlorure (Whitcomb et Lowe, 2007).
- Le domaine B, le plus petit domaine, qui est adjacent à la structure du domaine A, est formé d'une boucle de 64 résidus d'acide aminé et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif. Il est renfermé dans la liaison des ions Ca^{2+} qui jouent un rôle structural et participent à la stabilité de l'enzyme (Boel et al, 1990 ; Mobini-Dehkordi et Afzal Javan, 2012; Elleuche et Antranikian, 2013).
- le domaine C est constitué d'un tonneau de 8 feuillets β antiparallèles (Kadziola et al, 1994).

Le site actif de l'enzyme composé de trois groupes d'acides aminés de couleur rouge et blanche, l'aspartate (197, 300) et le glutamate (233) qui

agissent en concordance pour séparer les liaisons entre les sucres dans la chaîne d'amidon. Cette structure se compose d'une courte chaîne de cinq unités de sucre (de couleur orange et jaune), le site de clivage est de couleur rose, l'ion de calcium est représenté par la sphère grise, où il stabilise la structure de l'enzyme. Mais aussi un ion chlorure activateur allostérique de l'enzyme représenté par une sphère verte (**Nielsen et Borchert, 2001**).

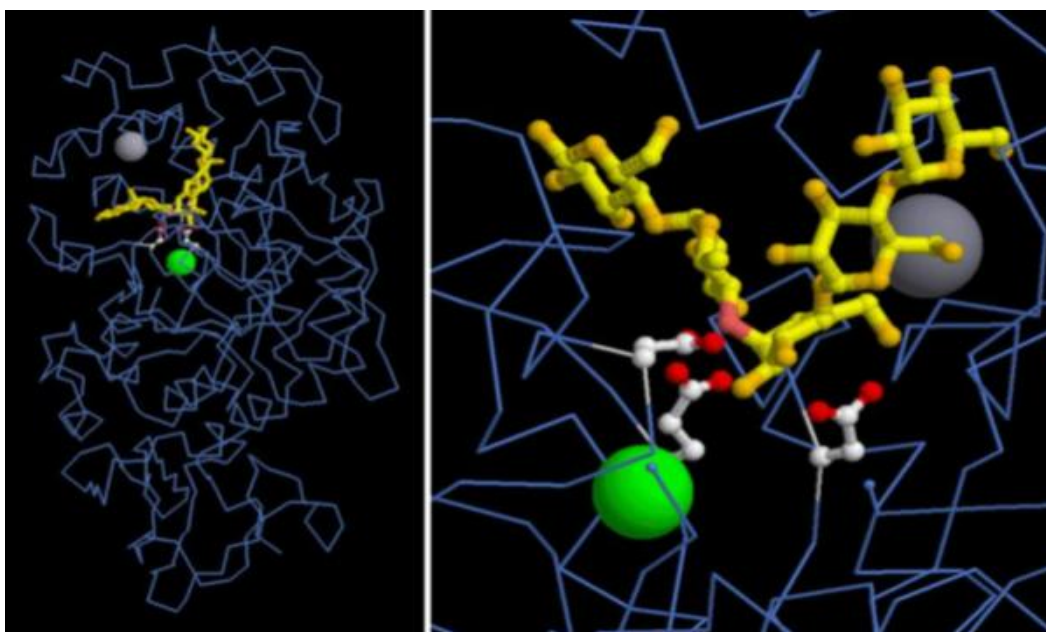


Figure04: Structure et site catalytique de l'alpha-amylase (**PDB, 2006**).

Blanche et rouge : trois groupements d'acides aminés, jaune et orange : cinq unités de sucre, rose : site de clivage, sphère grise : ion de calcium et une sphère verte : ion de chlorure.

5. Mécanisme d'action :

L'alpha-amylase pancréatique (E.C. 3.2.1.1) est une enzyme essentielle pour la digestion. Son rôle est de déclencher l'étape initiale d'hydrolyse de l'amidon en maltose et finalement en glucose. La dégradation de l'amidon se fait rapidement par cette enzyme et conduit à une hyperglycémie postprandiale élevée (PPHG). Il a été démontré que l'activité de l' α -amylase pancréatique humaine (HPA) dans l'intestin grêle est liée à une augmentation des taux de glucose postprandial, dont le contrôle est donc un aspect important dans le traitement du diabète (**Eichler et al, 1984**).

6. Métabolisme des hydrates de carbone :

L'alpha-amylase salivaire décompose partiellement les hydrates de carbone provenant de l'alimentation en les transformant en oligosaccharides, qui sont ensuite catalysés par l'alpha-amylase pancréatique dans l'intestin qui formera le maltotriose, le maltose et les oligodéxtrans.

L'alpha-glucosidase agit sur le maltotriose et le maltose pour former un monosaccharide (glucose) qui pourra s'enfoncer dans les vaisseaux sanguins. La digestion des glucides après les repas conduit à une hyperglycémie postprandiale (PPHG) dans le cas des diabétiques de type 2 (**Bhat et al, 2008; Sudha et al, 2010; Sudha et al, 2011**).

7. Inhibition d'alpha amylase :

L'alpha-amylase joue un rôle important dans le processus de digestion des hydrates de carbone complexes. C'est la cause pour que l'inhibition de l'enzyme puisse retarder la digestion des oligosaccharides et des disaccharides, ce qui va retarder l'absorption du glucose ainsi que la réduction du taux de glucose dans le plasma, arrivant finalement à la suppression de l'hyperglycémie postprandiale (**Lebovitz, 1997**).

Il existe des médicaments capables d'inhiber l'activité de l'alpha-amylase et retarder la digestion des hydrates de carbone, et donc la réduction d'hyperglycémie postprandiale (**He, 1998**). Pour les patients atteints de diabète de type II, L'Acarbose, le miglitol et le voglibose sont largement utilisés, isolés ou en combinaison avec des sécrétagogues d'insuline.

Le règne végétal est un vaste domaine de recherche, plus de 1200 espèces végétales ont été enregistrées pour être employées empiriquement dans le monde entier pour leur présumer une activité hypoglycémique. De ce fait, les inhibiteurs naturels de l'alpha-amylase émanent de sources végétales offrent une stratégie prenante pour le contrôle de l'hyperglycémie (**Tundis et al, 2010**).

Un nombre grandissant d'enquêtes ont évalué la possible efficacité des inhibiteurs d'alpha-amylase dans le traitement du diabète, au cours des dernières années (**Buisson et al, 1987**).

Matériel et méthodes

1. Objectifs :

Notre étude expérimentale se base sur l'étude phytochimique de la partie aérienne de *RubusUlmifolius*.L. Elle a été réalisée au sein du laboratoire de recherche « LAPRONA » laboratoire des Produits Naturels. Université d'Abou Bekr Belkaid -Tlemcen-

Nous avons commencé par réaliser des études phytochimiques qualitatives, et aussi des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins. Et à la fin, nous avons évalué le pouvoir inhibiteur des extraits phénoliques sur l' α -amylase.

2. Matériel végétal :

Les feuilles de *Rubus Ulmifolius* ont été récoltées de la région de Tlemcen en Mars 2021. On les a séchées, broyées, et conservées dans des bocaux en verre hermétiquement fermés à température ambiante pour des analyses ultérieures.

3. Préparation d'extrait :

- Extraction :

On a pris trois grammes de la matière végétale séchée, qui ont subi une extraction sous reflux par 150 ml d'hexane pendant 1h, après la filtration, on a récupéré le marc. Ensuite une deuxième extraction de ce dernier toujours avec la même méthode de sous reflux par le méthanol/acétone (70 /30) (v : v) a été faite pendant 1h. On a obtenu l'extrait, après nous l'avons filtré sur papier filtre, puis évaporé dans une étuve à 45°C. Le résidu obtenu a été conservé à 4°C.

- Calcul de rendement de l'extrait :

Le rendement de l'extraction des feuilles de *RubusUlmifolius* est donné par la formule suivante:

$$\text{Rdt \%} = [P_1 - P_2 / P_3] \times 100.$$

P1 : Poids du ballon après évaporation ;

P2 : Poids du ballon vide ;

P3 : Poids de la matière végétale sèche de départ.

4. Quantification de quelques classes phénolique dans l'extrait :

4.1. Les polyphénols totaux : Le « Folin-Ciocalteu », est un réactif utilisé de couleur jaune, c'est un mélange d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) avec l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$). L'objectif de cette méthode est l'oxydation par ce réactif des composés phénoliques. La formation d'un nouvel ensemble molybdène-tungstène est entraînée par cette oxydation, il est de couleur bleu et il est absorbé à une longueur d'onde de 750nm.

Le dosage est pratiqué par la comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue (**Boizot et al, 2006**).

On mélange 100µl de l'extrait avec 2000µl d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2%, puis on vortex le mélange. Après 5 min à température ambiante on ajoute 100µl de réactif de Folin-Ciocalteu (1N), on agite encore une fois, ensuite on incube le mélange pendant 30min à une température ambiante à l'obscurité, on mesure l'absorption contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 750nm.

Une gamme d'étalonnage à base d'acide gallique est préparée à des concentrations allant de 50 à 400 µg/ml. Les teneurs en polyphénols totaux des extraits sont alors exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g MS) (**Vermerris et al, 2006**).

4.2. Les flavonoïdes totaux : Le but de cette méthode est l'oxydation des flavonoïdes par deux réactifs incolores, le nitrite de sodium ($NaNO_2$) et le chlorure d'aluminium($AlCl_3$). Elle entraîne la formation d'un ensemble brunâtre qui peut être absorbé à une longueur d'onde de 510nm. La teneur totale en flavonoïdes est déterminée par une comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue.

L'évaluation des flavonoïdes est faite par une méthode décrite par (**Dewanto et al, 2002**).

250µl d'extrait diluée dans 1000µl d'eau distillée est ajoutée à 75µl du réactif $NaNO_2$ (nitrite de sodium) à 15%. Après 6 min d'incubation à

température ambiante, on ajoute 75µl de la solution préparée de chlorure d'aluminium (AlCl₃, 10%) au mélange.

Ensuite, après 6 min d'incubation à température ambiante, on ajoute 1000µL de NaOH à 4% au mélange, ainsi que 100µl d'eau distillée. Puis le mélange est incubé pendant 30min à une température ambiante à l'obscurité, on mesure par la suite l'absorption contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 510 nm. Une gamme d'étalonnage à base de catéchine est également préparée à des concentrations allant de 50 à 400µg/ml. Les teneurs en flavonoïdes des extraits sont alors exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g MS).

4.3. Les tanins condensés : à l'aide d'acide chlorhydrique (HCl) on fait une dépolymérisation des tanins condensés, ils se transforment en anthocyanidols de couleur rouge par réaction avec la vanilline, le mélange est absorbé à une longueur d'onde de 500 nm. 50µl d'extrait est ajoutée à 1500µl de vanilline à 4%. On agite le mélange, puis on ajoute 750µl de HCl. Après, le mélange est mis en incubation à température ambiante pendant 15 min. On mesure ensuite l'absorption contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 500 nm. Les teneurs en tanins condensés sont étudiés à l'aide d'une gamme d'étalonnage de catéchine à des concentrations de 50 à 400 µg/ml, sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/ gMS) (Sun et al, 1998).

5. Estimation des activités inhibitrice d'alpha amylase, *in vitro* :

5.1. La présence des réactifs : (Bernfeld, 1955).

- Réactif 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) :

Dans un Erlen Meyer, on dilue 1g de DNSA avec 40ml d'eau distillée. Après on ajoute 30g de tartrate double de sodium et de potassium à cette solution, après agitation on obtient une solution de couleur jaune opaque. Ensuite, On ajoute 20ml d'une solution de NaOH 2N à ce mélange ce qui le rendra clair avec une couleur orange. On ajuste le volume obtenu à 100ml avec de l'eau distillée. Le réactif obtenu est conservé dans l'obscurité à 4°C.

- Solution de l'alpha amylase :

On utilise comme enzyme l'alpha amylase (E.C.3.2.1.1) issue du pancréas du porc (PPA) et elle est sous forme lyophilisée (Fluka), son poids moléculaire est de 13000 Da avec une activité spécifique de 13 UI/mg, est conservée à +4C°.

- **Solution de substrat :**

Le substrat utilisé est l'amidon soluble. À une concentration de 1%, la solution d'amidon est préparée dans la solution tampon phosphate (0,02 M, pH 6,9), pour qu'on réalise les tests sur l'alpha amylase.

- **Solution d'Acarbose :**

L'Acarbose « LARIMEL®50 » est un pseudo-tétra-saccharide d'origine microbienne. Il est utilisé dans cette expérience comme contrôle positif (molécule de référence) pour comparer son activité vis-à-vis de l'alpha amylase par rapport à celle des extraits.

1 comprimé de 50 mg est solubilisé dans 50 ml de tampon phosphate.

5.2.Mode opératoire :

Cette méthode est réalisée selon le protocole de **Thalapaneni et al, 2008** avec modifications:

On prépare une gamme de concentration (dilution en cascade) et on teste l'effet de chaque concentration de l'extrait sur l'activité de l'alpha amylase.

- Tube d'essai : 200 µl solution d'extrait ou d'Acarbose + 200 µl solution enzymatique.
- Agiter les tubes et les incubent pendant 10 min à 37 C°.
- Ensuite, on ajoute 200 µl d'amidon dans tous les tubes, et les incubent pendant 15 min.
- Après, 400 µl de DNSA est ajoutée dans tous les tubes et les placer dans un bain marie bouillant pendant 5 min à 100 C° pour stopper la réaction enzymatique.
- Afin de stopper la réaction entre le maltose et DNSA on possède à un choc thermique, on pose les tubes dans un bain d'eau glacée.
- On mesure les densités optiques au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm.
- Calculer les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration :
- Inhibition d'alpha amylase = $(Do_{contrôle} - Do_{extrait} / Do_{contrôle} \times 1)$.

Résultats et discussion

I. Étude phytochimique :

1. Rendement de l'extrait brut :

La préparation des extraits à partir de la partie aérienne de *Rubus ulmifolius L.* et plus précisément les feuilles de cette dernière a été effectuée par l'extraction consécutive dans de l'hexane puis le méthanol/acétone (70/30) (v/v) et cela sous-reflux. Le processus a été réalisé pendant 1h pour chaque solvant.

Le rendement obtenu par notre espèce est de 26.74%. Les résultats, sur la partie aérienne (feuilles) de *Rubus ulmifolius* ont présenté un très bon rendement, ce qui est nettement plus supérieur aux résultats trouvés de la même espèce par **Benghnima (2020)** qui était de 19.05%.

Ivona et al, (2016) ont travaillé sur l'espèce *Rubus discolor*, récolté de 2 régions différentes (Belgrade et Cer). Leur extraction à été faites par plusieurs solvants différents : aqueux, Méthanol, Ethanol, Acétone, pour des rendements obtenus de la région de Belgrade : 8.67, 10.62, 5.23, 2.78 respectivement, et pour la région de Cer est de : 11.03, 8.80, 3.77, 1.92 respectivement, cela reste inférieur à celui de notre étude.

2. Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins :

2.1. Les polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux (PT), a été fait selon la méthode du réactif de Folin-Ciocalteu en référence à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ($Y = 0.002x$) (**Figure 5**). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/gMS).

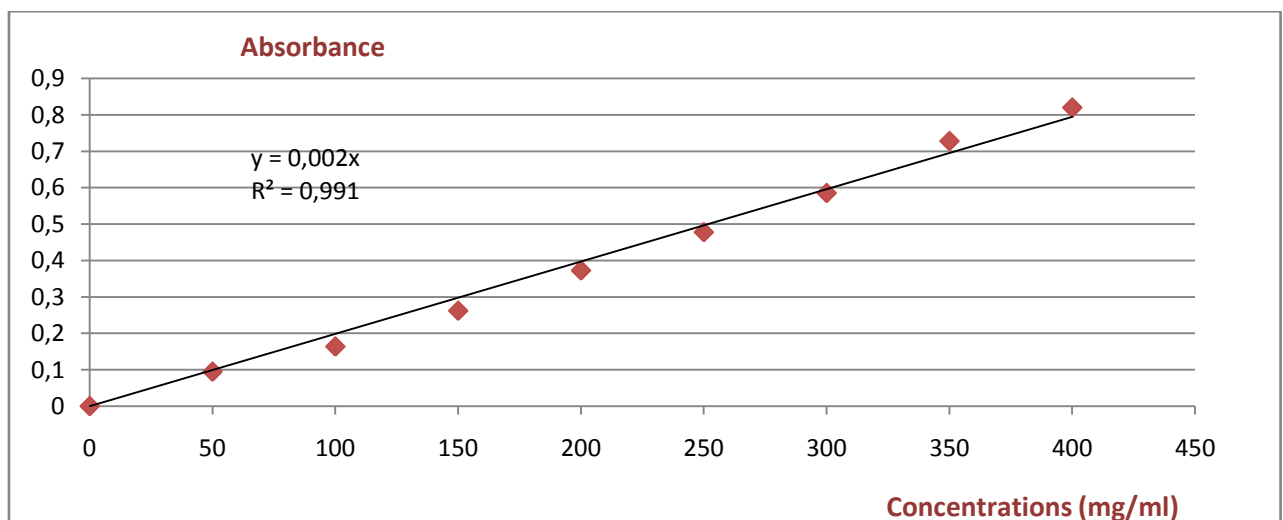


Figure 05 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Le dosage des polyphénols de la partie aérienne de notre espèce de murier, nous a donné une teneur de 59.11mgEAG/g.

Cette teneur obtenue est nettement plus supérieure à celle obtenue par (Dall aqua et al, 2008) sur la même espèce et qui est de $(27,6 \pm 0.8 \text{ mg EAG/g Ps})$, contre un résultat nettement inférieure de celui obtenues par Luis et al, (2011) et qui est de $(167,6 \pm 6,1 \text{ mgEAG/gPs})$.

Les travaux d'Ivona et Al, 2016 réalisés sur les feuilles de l'espèce Rubus discolor et qui ont été récoltés dans 2 régions différentes, on obtenus plusieurs concentrations pour différents solvants : aqueux, méthanol, éthanol, acétone. Pour celles récoltées de la région de Belgrade les valeurs étaient de : 359.19 ± 9.51 , 277.19 ± 2.04 , 250.05 ± 3.90 , 289.46 ± 5.80 respectivement. Et pour celles récoltées de la région de Cer les valeurs étaient de : 446.61 ± 6.01 , 341.14 ± 3.01 , 414.05 ± 1.00 , 407.68 ± 27.03 respectivement.

2.2. Les Flavonoïdes totaux :

Le dosage des flavonoïdes totaux, a été fait selon la méthode du réactif de trichlorure d'aluminium (AlCl_3). La teneur a été exprimée par référence à la courbe d'étalonnage de la catéchine ($Y = 0.0028x$) (Figure 06). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg CE/g MS).

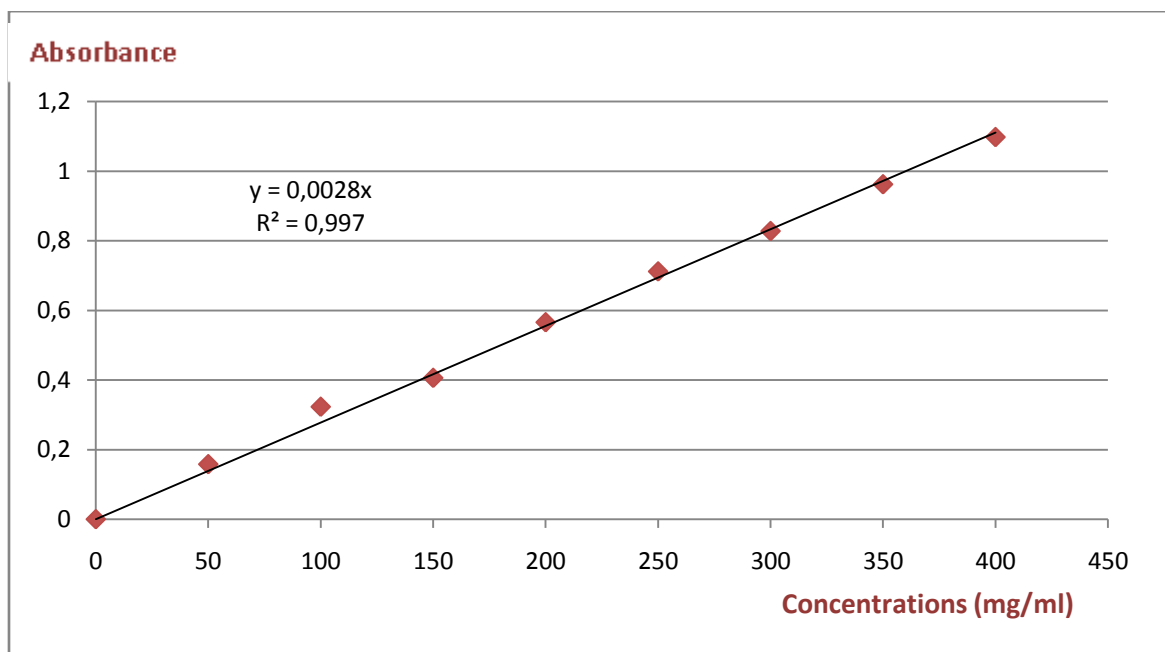


Figure 06: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Le dosage des flavonoïdes de la partie aérienne, nous a donné une teneur de 19.04mgEAG/g.

Cette teneur reste inférieure par rapport aux travaux trouvés par **Ivona et Al, (2016)** pour l'espèce *Rubus discolor*, toujours récoltée dans 2 régions différentes, dont ils ont trouvés concentrations pour différents solvants : aqueux, méthanol, éthanol, acétone. Pour les feuilles récoltées de la région de Belgrade les valeurs étaient de: 35.63±±0.37, 36.74±±0.47, 24.49±±0.27, 61.15±±0.60 respectivement. Et pour les feuilles récoltées de la région de Cer les valeurs étaient les suivantes : 22.44±±0.44, 30.97±±0.76, 28.95±±0.31, 45.35±±1.74 respectivement.

2.3. Les tanins :

La teneur des tanins a été estimée en référence à la courbe d'étalonnage de la catéchine ($Y = 0.00028x$). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg CE/g MS) (**figure 07**).

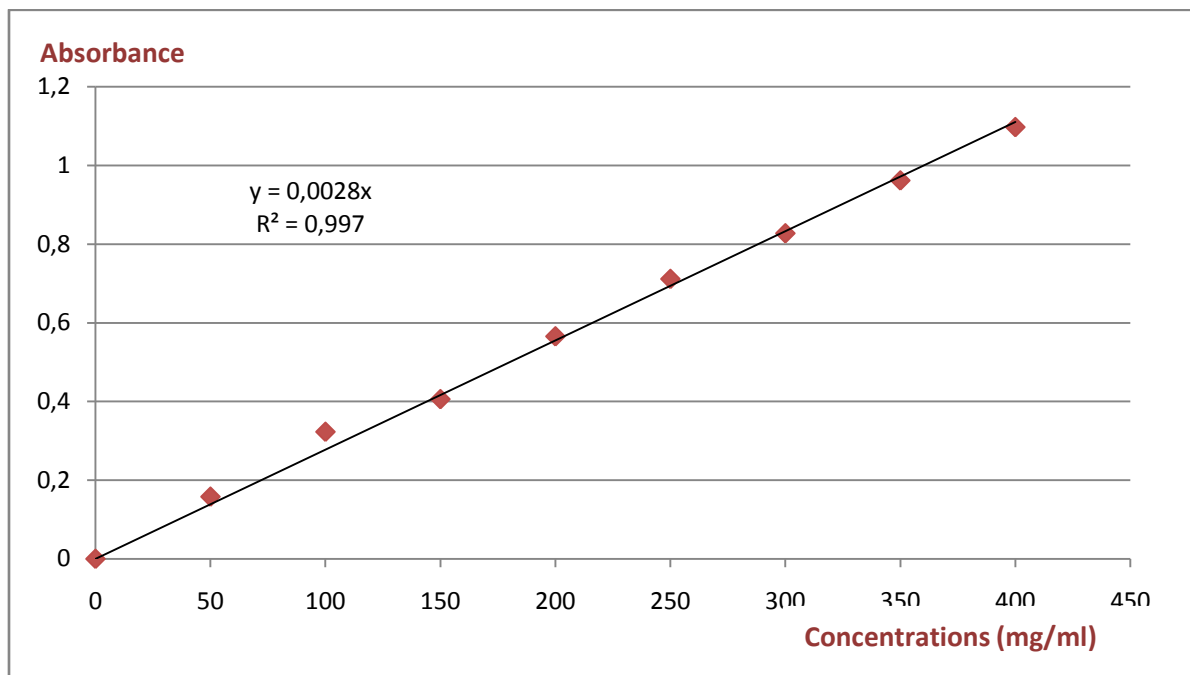


Figure 07: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

Le dosage des tanins de la partie aérienne, nous a donné une teneur de 11.11mgEAG/g.

3. Effet inhibiteur des extraits de *rubus ulmifolius* sur l'activité d' α -amylase porcine in vitro :

Un ensemble d'outils thérapeutiques pour soigner les diverses formes de diabète, est mis à notre disposition. L'inhibition des enzymes digérant les hydrates de carbone tels que l' α -amylase est l'une de ces outils thérapeutiques (**Narkhede et al, 2011**). L' α -amylase dégrade les amidons complexes en oligosaccharides, L'inhibition de ces enzymes produit

un effet antihyperglycémique postprandial en diminuant la vitesse de l'absorption du glucose (He, 1998 ; Okoli et al, 2011). Actuellement, il existe des médicaments antidiabétiques qui ont des effets secondaires (Chakrabarti et Rajagopalan, 2002). Pour cela on se trouve dans l'urgence d'identifier et d'explorer les sources naturelles avec moins d'effets secondaires pour tels inhibiteurs.

Le pouvoir d'inhibition de notre extrait phénolique des feuilles de *Rubus ulmifolius* sur l'activité de α -amylase nous a donné une valeur estimée à 1.80 mg/ml par rapport à l'IC₅₀ de l'Acarbose estimée à 0.056 mg/ml.

Plus l'IC₅₀ est faible plus le pouvoir d'inhibition est élevé. Notre teneur présente un effet non négligeable de cette activité par rapport à la molécule de référence qui est l'Acarbose.

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'activité inhibitrice des feuilles de *Rubus Ulmifolius* sur alpha amylase.

L'étude réalisé in vivo par Akhtar et Al, (2017) sur l'évaluation des effets anti hyperglycémiant des parties aériennes de *Rubus Ulmifolius*, sur streptozotocine-souris albinos diabétiques induites, ont conclu que l'extrait de *Rubus Ulmifolius* avait un effet hypoglycémiant de ces extraits sur ces souris diabétiques albinos.

Les études réalisées par Sebnem et Hulya, (2016) ont montré une inhibition de l'alpha amylase pour la variété de murier sauvage et ont confirmé que les composés phénoliques déterminés dans leur expérimentation étaient responsable de cette inhibition. On suggère que les feuilles de murier peuvent être considérées comme une source potentielle pour l'activité antidiabétique et prometteuse pour les applications pharmaceutiques, nutraceutiques et aliments fonctionnels industriels.

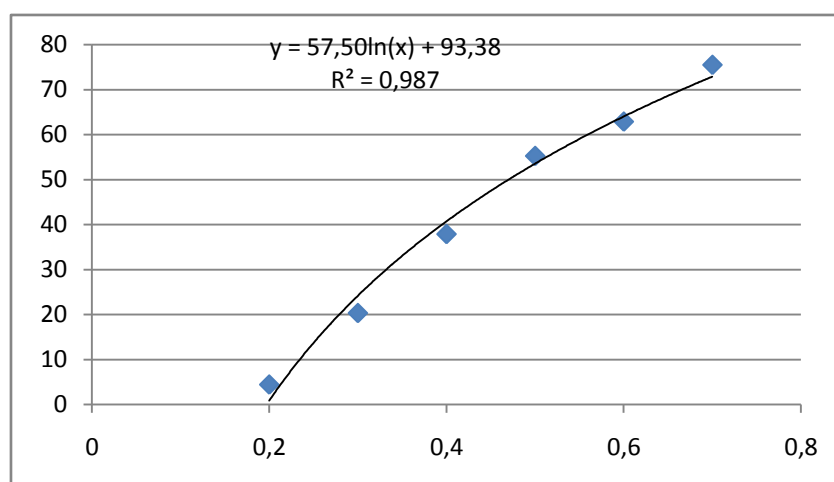


Figure 08 : taux d'inhibition de l'extrait sur l'alpha amylase

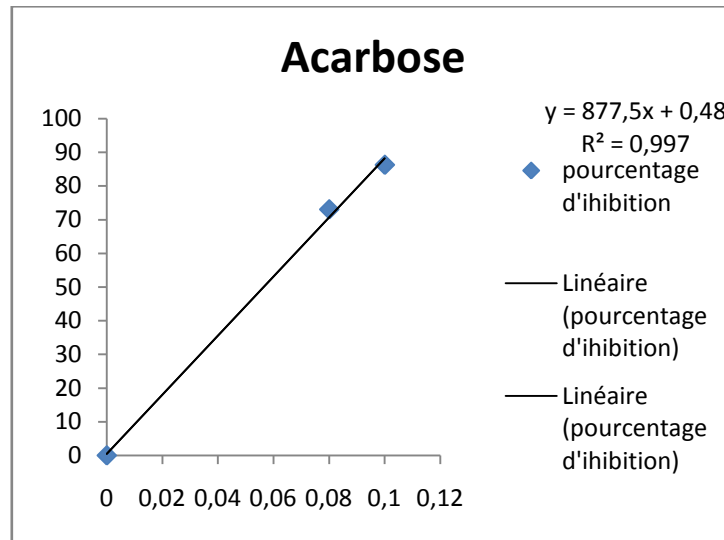


Figure 09: Effet inhibiteur de l'acarbose sur α -amylase (contrôle positif)

**Conclusion
générale.**

Au cours des dernières années, les plantes dites naturelles ont été largement étudiées, car elles sont considérées comme des sources primaires de nombreux composés bioactifs, en particulier des antioxydants ainsi que des antidiabétiques naturels tels que les polyphénols, et présentent de puissants effets médicaux et nutritifs (**Ekor, 2014**).

Dans ce travail, on s'est intéressé à la quantification de quelques composés phénoliques ainsi que l'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits phénoliques sur l'activité d'alpha amylase. Cet extrait a été préparé par une extraction sous-reflux à partir de la partie aérienne de *Rubusulmifolius* .L, qui est une plante médicinale traditionnellement utilisée pour le traitement de certaines maladies.

Le rendement d'extraction des feuilles par la méthode de reflux, en utilisant le méthanol/acétone comme solvant, est de 26.74%. L'analyse quantitative de l'extrait a donné une concentration en polyphénols de 59.11mg EAG/g MS, en flavonoïdes de 19.04 mg EC/g MS, et en tanins de 11.11mg EC/g MS.

Notre expérimentation nous a permis d'évaluer l'inhibition de notre extrait phénolique sur l'activité d'alpha amylase avec une IC_{50} égale à 0.47 mg/ml.

En effet, notre travail reste préliminaire et l'extrait de la plante constitue un réservoir très intéressant pour des recherches ultérieures qui vont nous ouvrir des horizons de recherche ciblés vers cette plante en raison du manque des études concernant cette plante par rapport à leur richesse par plusieurs composés chimiques important dans le domaine de la médecine traditionnelle, notamment en termes de mise en évidence des principes actifs et l'évaluation de leurs activités biologiques.

En perspective il serait intéressant de :

- Compléter l'étude in vitro de l'effet inhibiteur de l'alpha amylase par des études in vivo chez des animaux de laboratoire.
- L'identification, la caractérisation et la séparation des différents composés présents dans l'extrait responsable de l'effet inhibiteur vis-à-vis de l'alpha amylase.
- La recherche d'éventuels effets indésirables de ces extraits (toxicité).
- Evaluation des autres activités biologique éventuelles telles que l'activité antioxydant, antibactérienne, anti inflammatoire et anti cancéreuse d'extrait de murier.

Référence bibliographique

- Abrams. CK, Hamosh. M, Dutta. SK, Hubbard. VS, Hamosh. P, (1987).** Role of nonpancreatic lipolytic activity in exocrine pancreatic insufficiency. *Gastroenterology*. 92:125–129
- Ait Kaki- El-Hadef El-Okki. H, Leghlimi. S, Dakhmouche. L, Bennamoun, Meraihi. Z, (2012).** utilisation de la planification experimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *rhizopus oryzae*, *Rev. Microbiol. Ind. San. et Environn.* 6 : 1-17.
- Akhtar. K, Shah. S. W. A, Shah. A. A, Shoaib. M, Haleem. S. K, Sultana. N, (2017).** Pharmacological effect of *Rubus ulmifolius* Schott as antihyperglycemic and antihyperlipidemic on streptozotocine (STZ)-induced albino mice. *Applied Biological Chemistry*. 60: 411-418.
- Ali. N, Shaoib. M, Shah. S. W. A, Shah. I, Shuaib. M, (2017).** Pharmacological profile of the aerial parts of *Rubus ulmifolius* Schott. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17: 1-59.
- Allali. H, Benmehdi. H, Dib. M. A, Tabti. B, Ghalem. S, Benabadji. N, (2008).** Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. *Asian journal of chemistry*. 20: 2701-2710.
- Alpers. D. H, (1994)** Digestion and absorption of carbohydrates and proteins. In: Johnson LR (ed) *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York. 1723–1749
- Anderson. R. A, Polansky. M. M, (2002).** Tea enhances insulin activity. *J Agric Food Chem*. 50: 7182-6.
- Bailey. C. J, Day. C, (1989).** Traditional plants medicines as treatment for diabetes. *Diabetes Care*. 12: 553-564.
- Berman. H.M, Westbrook. J, Feng Z, Gilliland. G, Bhat. T. N, Weissig. H, Shindyalov. I. N, Bourne P. E, (2000).** The Protein Data Bank *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242.
- Bernfeld. P, (1955).** Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, 149-158.
- Bhat. M, Zinjarde. S. S, Bhargava. S. Y, RaviKumar. A, Joshi. B. N, (2011).** Antidiabetic Indian Plants: A good source of potent amylase inhibitors. Evidence based *Complementary and Alternative Medicine*. 1-6.

- Bloom. A.J, Ireland. J (1981).** *Atlas en couleurs du diabète*. Paris: Maloine, 118.
- Boel. E, Brady. L, Brzozowski. A. M, Derewenda. Z, Dodson. G. G, Jensen. V. J, Petersen. S. B, Swift. H, Thim. L, Woldike. H. F, (1990).** Calcium binding in. alpha.-amylases: an xray diffraction study at 2.1-Å. Resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry* 29(26): 6244-6249
- Boizot. N, Charpentier. J. P, (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. 79-82.
- Bonina. F. P, Leotta. C, Scalia. G, Puglia. C, Trombetta. D, Tringali. G, Roccazzello. A. M, Rapisarda. P, Saija. A, (2002).** Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract.
- Boukef. M. K, (1986).** Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Agence de coopération culturelle et technique, Paris. Francia. 208.
- Bruneton. J, (1999).** Tanin, Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. *In* Technique et Documentation. Lavoisier, Paris, France. 370-404.
- Buisson. G, Duee. E, Haser. R, Payan. F, (1987).** Three dimensional structure of porcine pancreatic α -amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *The EMBO Journal*. 6(13): 3909-3916.
- Chatterton. R, Vogelsong. K, Lu. Y, Ellman. A, Hudgens. G, (1996).** Salivary α -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clinical physiology*, 16(4) : 433-448.
- Chi. Z, Chi. Z, Liu. G, Wang. F, Ju. L, Zhang. T, (2009).** *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 27(4), 423–431.
- Clementi. F, Jone. R, (1986).** α -amylase and glucoamylase production by *Schwanniomyces castellii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 52: 343-352.
- Collège national des gynécologues et obstétriciens français, Société francophone du diabète.** Extrait des mises à jour en Gynécologie et Obstétrique : recommandations pour la pratique clinique. Le diabète gestationnel. Paris: CNGOF; 2010. 15 p.

- Coolbear. T, Daniel. R, Morgan. H, (1992).** The enzymes from extreme thermophils: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Advanced Biochemistry and Engineering Biotechnology*, 45: 57–97.
- Das. H, Wong. J, Lien. E, (1994).** Carcinogenicity and cancer prévening actvitis of flavonoides: A structure-system-activity-relationship (SSAR) analysis.
- Dauter. Z, Dauter. M, Brzozowski. A, Christensen. S, Borchert. T, Beier. L, Wilson. K, Davies. G, (1999).** X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7A resolution. *Biochemistry*, 29; 38(26):8385-92.
- De Moraes. L, Filho. S, Ulhoa. C, (1999).** Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 561–564.
- De Mot. R, Verachlert. H, (1985).** Purification and Characterization of Extracellular Amyolytic Enzymes from the Yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(6): 1474–1482.
- De Mot. R, Verachttert. H, (1986).** Secretion of alpha-amylase and multiple forms of glucoamylase by the yeast *Trichosporon pullulans*. *Can j microbial*, 32 (1): 47-51.
- Dewanto. V, Wu. X, Adom. K, Liu. R, (2002).** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3010-3014.
- Dewi. R. T, Iskandar. Y. M, Hanafi. M, Kardono. L. B. S, Angelina. M, Dewijanti. I. D, (2007).** Effet inhibiteur de Koji *Aspergillus terreus* sur l'activité de l'a-glucosidase et l'hyperglycémie postprandiale. *Pak J Biol Sci*. 10: 3131–3135.
- Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, (2012).** *Diabetes Care*, 35, S64–S71.
- Dimitrakoudis. D, Vranic. M, Klip. A, (1992).** Effects of hyperglycemia on glucose transporters of the muscle: use of the renal glucose reabsorption inhibitor phlorizin to control glycemia.
- Eddouks. M, Ouahidi. M. L, Farid. O, Moufid. A, Khalidi. A, Lemhadri. A, (2007).**

L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc.
Phytothérapie, 5: 194-203.

édition Maloine S.A, vol.01, 233p.

Eichler. H, Korn. A, Gasic. S, (1984). The effect of a new specific α -amylase inhibitor on post-prandial glucose and insulin excursions in normal and Type 2 (non-insulindependent) diabetic patients, *Diabetologia*. 26(4): 278–281.

Elleuche. S, Antranikian. G, (2013). Starch-Hydrolyzing Enzymes from Thermophiles. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, 509–533.

Ernst. E, (1997). Plants with hypoglycemic activity in humans. *Phytomedicine*, 4(1): 73-8.

Evans. K. J, Symon. D. E, Whalen. M. A, Hosking. J. R, Barker. R. M, Oliver. J. A, (2007). Systematics of the *Rubus fruticosus* aggregate (Rosaceae) and other exotic *Rubus* taxa in Australia. *Australian Systematic Botany* 20. 187-251.

Farber. G, Petsko. G, (1990). The evolution of barrel enzyme. *Trends in biochemical science*, 15: 228-234.

Ferrez. Y, Bornand. C, (2019). Nouvelles observations de taxons de *Rubus* (sous-genre *Rubus*) dans le canton de Vaud. *Bulletin du Cercle vaudois de botanique*, 48 : 125-140.

Ferrez. Y, Royer. J. M. (2015). Identification de dix espèces communes de *Rubus* du nord-est de la France. *Les Nouvelles Archives de la Flore jurassienne et du nord-est de la France*, 13 : 121-142.

Fiorucci. S, Golebiowski. J, Cabrol-Bass. D, Antonczak. S, (2006). Molecular simulations reveal a new entry site in quercetin 2, 3-dioxygenase.

Folta. K. M, Gardiner. S. E, (2009). Genetics and genomics of Rosaceae. New York: Springer, 6: 411-506.

Formica. J. V, Regelson. W, (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33(12): 1061 - 80.

- Gray. A. M, Flatt. P. R, (1997).** Pancreatic and extra-pancreatic effects of the traditional anti-diabetic plant *Medicago sativa* (lucerne). *Br J Nutr*; 78: 325-34.
- Grover. J. K, Yadav. S, Vats. V, (2002).** Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J. of Ethnopharmacol*, 81:81-100.
- Hamza. N, (2011).** Effets préventif et curatif de trois plantes médicinales utilisées dans la Wilaya de Constantine pour le traitement du diabète de type 2 expérimental induit par le régime « high fat » chez la souris C57BL/6J. Thèse Doctorat en science alimentaire option :Nutrition. Univ. Mentouri Constantine, Institut de Nutrition de l'alimentation et des Technologies agroalimentaires : 32-61.
- Harbone. J. B, (1998).** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. 3 ème édition.
- He. L, (1998).** Alpha-glucosidase inhibitors as agents in the treatment of diabetes. *Diabetes Rev*, 6: 132–145.
- Heslot. H, Menez. A, (1996).** L'ingénierie des protéines et ses applications. *Lavoisier Tec et Doc*, 424-432.
- Hummer. K, (2010).** Rubus Pharmacology. Antiquity to the Present, 45(11) :1587-1591.
- Ivorra. M. D, Paya. M, Villar. A, (1989).** A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. *J Ethnopharmacol*, 27: 243-75.
- Kadziola. A, Abe. J, Svensson. B, Aser. R, (1994).** Crystal and molecular structure of barley- amylase. *Journal of Molecular Biology*, 239: 104-121.
- Kambouche. N, Merah. B, Derdour. A, Bellahouel. S, Bouayed. J, Dicko. A, Younos. C, Soulimani. R, (2009).** Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of *Anabasis articulata* (Forssk) Moq (Chenopodiaceae), an Algerian medicinal plant. *African Journal of Biotechnology*, 8(20): 5589-5594.
- Kandra. L, (2003).** α -Amylases d'importance médicale et industrielle. *J Mol Struct*, 666-667 : 487-498.

- Karn. R, (1978).** The comparative biochemistry, physiology, and genetics of animal alpha-amylases. *Adv Comp Physiol Biochem*, 7:1–103
- Keating. L, Kelly. C, Forgartry. W, (1998).** Mechanism of action and the substrate dependant pH maximum shift of the- amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Research*, 309(4): 311-318.
- Khacheba. I, (2008).** *Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur l'alpha – amylase*. Mémoire de fin d'études. Genie Biologique. Algerie : Université Amar Telidji – Laghouat.
- Kim. H. P, Son. K. H, Chang. H. W, Kang. S. S, (2004).** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*; 96 (3): 229- 45
- Kraulis. P, (1991).** Molscript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 24(5):946-950.
- Lamba. S. S, Buch. K. Y, Lewis. H, Lamba. H. J, (2000).** Phytochemicals as potential hypoglycemi agents. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21: 457- 496.
- Lazli. A, Beldi. M, Ghouri. L, Nouri. N. E. H, (2019).** Étude ethnobotanique et inventaire des plantes médicinales dans la région de Bougous (Parc National d'El Kala,- Nord-est algérien). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 88 : 22 – 43.
- Lebham, (2005).** Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. Université de Bretagne Occidentale (UBO).
- Lebovitz. H, (1997).** Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinol Metabol Clin North Am*. 26: 539-551.
- Lefuji. H, Chino. M, Imura. Y, (1996).** Raw-starch-digesting and thermostable –amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochem. J*, 15; 318 (3)(3): 989-96.
- Li. Heifeng, Chi. Zhenming, Wang. Xiadohong, Duan. Xiaohui, Ma. Liyan, Gao. Lingmei, (2007).** Purification and characterization of extracellular amylase from the

- marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzyme and Microbial technology*, 40(5): 1006-1012.
- Lundbæk. K, (1954).** DIABETIC ANGIOPATHY. *The Lancet*, 263(6808), 377–379.
- Mahmoudi. Y, (1987).** La thérapeutique par les plantes communes en Algérie. Blida, Edition ANES Palais du livre, 01 : 105.
- Manuel. Y, Keenoy. B, Vertommen. J, De Leeuw. I, (1999)** .The effect of flavonoid treatment on the glycation and antioxidant status in Type 1 diabetic patients.
- Marles. R. J, Farnsworth. N. R, (1995).** Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2: 13-189.
- Martini. S, D’Addario. C, Colacevich. A, Focardi. S, Borghini. F, Santucci. A, Rossi. C, (2009).** Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International journal of antimicrobial agents*, 34(1), 50-59.
- Masson. S, Mesléard. F, Dutoit. T, (2014).** Impacts de différents régimes de perturbations et niveaux de ressource hydrique pour contrôler une espèce proliférante dans un écosystème pseudo-steppique: le cas de *Rubus ulmifolius* Schott. Dans la plaine de la Crau (Bouches-du-Rhône, France). *Acta Botanica Gallica*, 161(3), 261-275.
- Mercier. C, (1985).** *Les enzymes amylolytiques*. In: Mouranche. A, Coste. C, hydrolases et dépolymérasés. Ed Gauthier-Villars, 110-140.
- Mobini-Dehkordi. M, Afzaljavan. F, (2012).** Application of alpha-amylase in biotechnology. *Journal of Biology and Today’s World*, 1(1): 39-50.
- Moranelli. F, Yaguchi. M, Calleja. G, Nasim. A, (1987).** Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Biochem Cell Biol.* 65(10): 899-908.
- N’guessan. K, Kadja. B, Zirihi. G, Traore. D, Ake-Assi. L, (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubo (Agboville, Côte-d’Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1): 1-15.

- Nielson. J, Borchert. T, Vriend. G, (2001).** The determinant of α -amylase pH activity profiles. *Protein Engineering. Oxford University Press.* 14(7): 505-512.
- Nouadri. T, (2011).** *L' α -amylase de Penicillium camemberti PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation.* Thèse de Doctorat. Biochimie /Biotechnologies. Constantine : Université Mentouri, 143.
- Organisation mondiale de la Santé. (2016).** Fait et chiffre sur le diabete.
- Ounaissia. K, Smati. D, Laredj. H, Djafer. R, Boualam. S, (2019).** Plantes cicatrisantes utilisées en médecine traditionnelle dans l'Est Algérien. *ALGERIAN JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, 7(1), 663-678.
- Panchal. C, (1990).** *Yeast strain selection.* Marcel Dekker. USA : CRC Press, 368.
- Panizzi. L, Caponi. C, Catalano. S, Cioni. P, Morelli. I, (2002).** In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacol*, 79(2), 165–168.
- Paris. R, Moyse. H, (1969).** *Precis de matiere medicale.* Masson & Cie. Paris.
- Peungvicha. P, Thirawarapan. S. S, Watanabe. H, (1998).** Possible mechanism of hypoglycemic effect of 4-hydroxybenzoic acid a constituent of *Pandanus odoratus* root.
- Prieto. J, Bort. B, Martinez. J, Randez. G, Buesa. C, Sanz. P, (1995).** Purification and Characterisation of new α - amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Biochem Cell Biol*, 73 (1-2): 41-9.
- Rahman. A. U, Zaman. K, (1989).** Medicinal plants with hypoglycemic activity. *J. of Ethnopharmacol*, 26: 1-55.
- Reynaud. J, Guilet. D, Terreux. R, Lussignol. M, Walchshofer. N, (2005).** Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. *Nat. Prod. Rep*; 22: 504-515.
- Roman-Ramos. R, Alarcon-Aguilar. F, Lara-Lemus. A, Flores-Saenz. J. L, (1992).** Hypoglycaemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Arch. Med. Res*, 23: 59-64.
- Sabu. M. C, Smitha. K, Ramadasan. K, (2002).** Anti-diabetic activity of green tea

- polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes .*J Ethnopharmacol*; 83: 109- 116.
- Saha. B, Freer. S, Bothast. R, (1994).** Production, purification and proprieties of a thermostable (beta)-glucosidase from a color variant strain from *Aureobasidium pullulans*. *Appl Environ Microbiol*, 60(10): 3774-3780.
- Schomburg. D, Salzmann. M, (1991).** *Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Germany: 1206.
- Sebai. M, Boudali. M, (2012).** La phytothérapie entre la confiance et mefiance. Mémoire professionnel infirmier de la sante publique, 6.
- Souilah. N, Madjrroubi. K, (2018).** Etude de la composition chimique et des propriétés thérapeutiques traditionnelles et modernes des huiles essentielles et des composés phénoliques de quelques espèces du Nord-est algérien. Thèse de doctorat : *Chimie organique*. Université des Frères Mentouri, Constantine 1, 95.
- Soumyanath. A, (2006).** Traditional Herbal Medicines for Modern Times: *Antidiabetic plants*. CRC Press (Taylor Francis Group), 6: 19 82.
- Spencer-Martins. I, Van Uden. N, (1979).** Extracellular amylolytic system of the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6(3): 241–250.
- Srinivasa. R, Reddy. G, Venkateswara Rao. G, Sambasiva. R, (2005).** Studies on the extraction and characterisation of thermostable -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology*, 4(3): 289-291.
- Steer. M, Levitzki. A, (1973).** The metal specificity of mammalian α -amylases as revealed by enzyme activity and structural probes. *FEBS Letters*, 31(1): 89-92.
- Stefanova. M, Emanuilova. E, (1992).** Characterization of a thermostable Amylase from *Bacillus brevis*. *European Journal of Biochemistry*, 207(1): 345-349.
- Sudha. P, Ravindran. R, Zinjarde. S, Bhargava. S, Ravi Kumar. A, (2011).** Evaluation of traditional Indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic amylase inhibitory effect in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 11 (5): 1-10.

- Sun. B, Richardo-da-Silvia. J, Spranger. I, (1998).** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of agricultural and Food chemistry*, 46(10), 4267-4274.
- Tabarki. S, Aouadhi. C, Mechergui. K, Hammi. K. M, Ksouri. R, Raies. A, Toumi. L, (2017).** Comparison of phytochemical composition and biological activities of *Rubus ulmifolius* extracts originating from four regions of Tunisia. *Chemistry & biodiversity*, 14(1).
- Thalapaneni. N, Chidambaram. K, Ellapan. T, Sabapati. M, Mandal. S, (2008).** Inhibition of carbohydrate digestive enzyme by *Talinum portulacifolium* leaf extract. *Jornal of complementary and integrative Medicine*, 5(1): 1-10.
- Ticli. B, (1997).** L'herbier de santé. 1^oédition, Paris, *édition VECCHI SAO*, 1-206.
- Trease. E, Evans. W, (1987).** Pharmacognosie. Biliaire Tindall, London 13th Edition. 61-62.
In: Karumi. Y, Onyeyili. P, Ogugduaja. V, (2004). Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume du pomme). *Journal of Medicine and scintific*. 4: 179-182.
- Trease. E, Evans. W. C, (1987).** Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13thed.
- Tsiomenko. A, Musaev. D, Lupashin. V, Kulaev. I, (1992).** Secreted Alpha-Amylase of the Basidiomycetous Yeast *Filobasidium-Capsuligenum* - Isolation, Purification, and Properties. *Biochemistry-Moscow*, 57. 297-303.
- Tundis. R, Loizzo. M, Menichini. F, (2010).** Natural products as alpha-amylase and alphaglucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Rev Med Chem*, 10(4): 315-31.
- Vallee. B, Stein. E, Summer. W, Fisher. E, (1959).** Metal content of alpha amylases of various origins. *Journal of Bioogical Chemistry*. 234(11): 2901-2929.
- Van Dam. R. M, Feskens. E. J, (2002).** Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus.

- Ventes de. P. M, de Souza. P. M, Simeoni. L. A, Magalhães. P. O, Silveira. D, (2012).** Inhibiteurs de l' α -Amylase: *étude de la matière première et des composés isolés à partir de plantes*. J Pharm Pharm Sci, 15 : 141-183.
- Verdrager. J, (1978).** Ces médicaments qui nous viennent des plantes. 1^oédition, Paris,
- Vermerris. W, Nicholson. R, (2006).** Phenolic Compound Biochemistry. Edition Springer.
- Wada. L, Ou. B, (2002).** Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(12): 3495–3500.
- Wanderley. K, Torres. F, Moraes. L, Ulhoa. C, (2004).** Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *Fems microbiology letters*. 231(2): 165-169.
- Whitcomb. D, Lowe. M, (2007).** Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive Diseases and Science*, 52(1):1-17.
- Wilson. J, Ingledeu. W, (1982).** Isolation and characterisation of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. *Applid and Environmental Microbiology*, 44(2) p: 301-307.
- Yalow. R. S, Berson. S. A, (1960).** Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Investig, 39:1157–1175.

ملخص

مرض السكري هو اضطراب شائع معروف بالعصور القديمة يحدث في كل جزء من العالم. يشكل تطوير علاجات جديدة من أصل نباتي خط بحث جديد يعتمد بشكل أساسي على النباتات الطبية التي استخدمها أسلافنا في علاج مرض السكري ومكافحته. ركز العمل الحالي على الدراسة الكيميائية النباتية والنشاط المثبط لألفا أميليز لمستخلص الأوراق المحضر عن طريق استخراج الارتداد الجزئي من . تم استخلاص الأوراق تحت التكتيف الراجع في الهكسان متبوعًا بالميثانول / الأسيتون. Rosacea من عائلة *Rubusulmifolius.L* نبات طبي تم تقييم DM / جم GAE وهو 59.11 مجم Folin-Ciocalteu ناتج المستخلص 26.74% تم تقدير محتوى البوليفينول الكلي باستخدام كاشف . تم تقييم العفص باستخدام طريقة DM / جم EC) محتوى 19.04 مجم AIC13 مركبات الفلافونويد باستخدام طريقة ثلاثي الكلوريد الألومنيوم () . ثم قمنا بتقييم تثبيط مستخلصنا ضد ألفا أميليز باستخدام أكاربوز كجزء مرجعي. أظهرت النتائج DM الفانيلين ، المحتوى هو 11.11 ملجم / جم التي تم الحصول عليها أن هناك نشاطًا مثبطًا جيدًا لمستخلصات الأوراق على نشاط ألفا أميلاز بقيمة 0.47 مل/مع والتي تظل أقل من تلك الموجودة في أكاربوز وهي 0.056 مل/مع.

Rubusulmifolius.L **الكلمات المفتاحية** ألفا أميليز، نشاط مضاد لمرض السكري، تحت الجزر، مركبات الفينول،

résumé.

Le diabète est un trouble fréquent connu depuis l'ancienneté survenant dans chaque partie du monde. Le développement de nouveaux traitements d'origine végétale forme un nouvel axe de recherche qui se base principalement sur les plantes médicinales utilisées par nos ancêtres dans le traitement et le contrôle du diabète.

Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique et l'activité inhibitrice de l'alpha amylase de l'extrait de feuilles préparé par une extraction sous-reflux d'une plante médicinale *Rubusulmifolius.L* de la famille Rosacée. Les feuilles ont été soumises à une extraction sous reflux dans l'hexane puis méthanol/acétone. Le rendement en extrait est de 26.74%. La teneur totale en polyphénols a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 59.11 mg GAE/g MS. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode de trichlorure d'Aluminium (AIC13), sa teneur est de 19.04mg CE/g MS. Les tanins ont été évalués en utilisant la méthode de la vanilline, sa teneur est de 11.11mg CE/g MS. Par la suite nous avons évalué l'inhibition de notre extrait vis-à-vis de l'alpha amylase en utilisant l'Acarbose comme molécule de référence. Les résultats obtenus montrent qu'il ya une bonne activité inhibitrice des extraits des feuilles sur l'activité d'alpha amylase avec une valeur d'IC₅₀ de 0.47 mg/ml et qui reste inférieure à celui de l'Acarbose qui est de 0.056 mg/ml.

Mot Clé : activité anti diabétique, alpha amylase, composé phénolique, *Rubus ulmifolius L.*, sous reflux .

abstract

Diabetes is a common disorder known for antiquity occurring in every part of the world. The development of new treatments of plant origin forms a new line of research which is based mainly on the medicinal plants used by our ancestors in the treatment and control of diabetes.

The present work focused on the phytochemical study and the alpha amylase inhibitory activity of the leaf extract prepared by a sub-reflux extraction of a medicinal plant *Rubusulmifolius.L* of the Rosacea family. The leaves were extracted under reflux in hexane followed by methanol / acetone. The extract yield is 26.74%. The total polyphenol content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, it is 59.11 mg GAE / g DM The flavonoids were evaluated using the trichloride method. Aluminum (AIC13), content is 19.04mg EC / g DM. Tannins was evaluated using the vanillin method, the content is 11.11mg CE / g DM. We then evaluated the inhibition of our extract against alpha amylase using Acarbose as a reference molecule. The results obtained show that there is a good inhibitory activity of the extracts of the leaves on alpha amylase activity with an IC50 value of 0.47 mg / ml and which remains lower than that of Acarbose which is 0.056 mg/ml.

Key word: alpha amylase, anti diabetic activity, phenolic compose, *Rubus ulmifolius L.*, under reflux

Annexes

Les D.O de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8
D.O	0.074	0.156	0.275	0.388	0.434	0.579	0.699	0.819
	0.121	0.192	0.241	0.365	0.484	0.602	0.738	0.809
	0.089	0.143	0.27	0.365	0.515	0.575	0.747	0.832

Les D.O de la courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8
D.O	0.152	0.316	0.397	0.568	0.73	0.802	0.959	1.104
	0.161	0.326	0.408	0.569	0.699	0.841	0.967	1.103
	0.161	0.327	0.413	0.56	0.706	0.84	0.96	1.086

Les D.O de la courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8
D.O	0.048	0.077	0.108	0.124	0.169	0.306	0.273	0.31
	0.033	0.077	0.124	0.138	0.185	0.218	0.244	0.319
	0.047	0.104	0.153	0.148	0.193	0.244	0.258	0.29

Les D.O de l'extrait pour le dosage des polyphénols.

Tube	1	2	3
D.O	0.209	0.255	0.336

Les D.O de l'extrait pour le dosage des flavonoïdes.

Tube	1	2	3
D.O	0.145	0.065	0.150

Les D.O de l'extrait pour le dosage des tanins.

Tube	1	2	3
D.O	0.088	0.055	0.067

Les D.O de l'extrait pour l'inhibition de l'alpha amylase.

Tube	1	2	3	4	5	6
D.O	0.8103	0.7032	0.5245	0.3765	0.314	0.2098
	0.8023	0.7023	0.5231	0.3823	0.313	0.2065
	0.8105	0.7014	0.5275	0.3761	0.3145	0.2054
	0.8077	0.7023	0.52503333	0.3783	0.31383333	0.20723333