

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

Département de Biologie

Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie,
Synthèse et Activité Biologique

THESE

Présentée par :

ABBOU Fayza

En vue de l'obtention du

Diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle en Biologie

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème

**Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante,
antidiabétique et anti-Alzheimer des extraits et des fractions
riches en composés phénoliques préparés de *Mentha pulegium* L.
et *Santolina chamaecyparissus* L.**

Soutenue le : ... / ... / 2022 devant le jury :

BOUCHERIT OTMANI Zahia	Professeur	Présidente	Univ. Tlemcen
AZZI Rachid	Professeur	Directeur de thèse	Univ. Tlemcen
CHAOUCHE Mohammed Tarik	MCA	Examineur	Univ. Tlemcen
NEMMICHE Said	Professeur	Examineur	Univ. Mostaganem
GHERIB Mohamed	Professeur	Examineur	C. Univ Naâma

Année universitaire 2021-2022

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant, Le miséricordieux, pour m'avoir donné la force, la patience et la volonté pour achever ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Mr Azzi Rachid, Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, pour avoir accepté de diriger ce travail. Il a su me donner une grande liberté d'initiative tout en restant toujours présent pour discuter les problèmes rencontrés. Je le remercie vivement pour son aide, ses encouragements, ses précieux conseils, sa confiance, sa patience, ... tout au long de la réalisation de ce travail.

Je voudrais remercier particulièrement Mme Boucherit-Otmani Zahia, Professeur à la Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen et responsable de la formation doctorale « Biochimie Appliquée » pour son aide, sa disponibilité, ses encouragements et l'intérêt qu'elle a toujours porté à cette recherche. Je lui exprime ma grande gratitude et mes sincères remerciements de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mes remerciements vont également à Mr Chaouch Mohammed Tarik maître de conférences classe «A» à la Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements à Mr NEMMICHE Saïd, Professeur à la Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, Université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie Mr GHERIB Mohamed, Professeur au centre universitaire de Naama d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à Mr Benamar Houari maître de conférences classe «A» à la Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, Université d'Oran 1, qui m'a soutenu et a suivi avec attention mon travail, pour sa disponibilité, son aide scientifique précieux et ses conseils qu'il a pu me fournir le long de ce travail.

Je remercie énormément Mr Bensouici Chawki Maitre de recherche A au Centre de Recherche en Biotechnologie Ali Mendjli à Constantine de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je le

remercie vivement pour son aide scientifique et pour tous ses conseils pendant la durée de ce travail.

Mes remerciements s'adressent à Mr. Smail Meziane, Docteur et Directeur de l'Institut Européen des Antioxydants, France, de m'avoir accueilli dans son Institut. Je le remercie vivement pour son aide scientifique et pour tous ses conseils tout le long de mon stage.

Mes profonds remerciements s'adressent également à Mme Kaci Mouna Docteur et directrice du département in vivo, Institut Européen des Antioxydants, France, pour son aide, sa disponibilité, ses précieux conseils ainsi que son soutien moral tout le long de mon stage.

Mes profonds remerciements s'adressent à Mme Benariba Nabila maître de conférences classe «A» à la Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, pour son aide, ses précieux conseils ainsi que son soutien moral.

Mes remerciements s'adressent à Mr Lahfa Boucif Farid, Professeur à la Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen pour ses conseils ainsi que pour l'intérêt et le soutien chaleureux dont il a toujours fait preuve.

Je tiens également à remercier chaleureusement toutes les équipes du laboratoire antibiotiques, antifongiques, physico-chimie synthèse et activité biologique «LAPSAB» où j'ai réalisé ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à mes amies Ouffai Khaoula, Fkheikher zohra et Berramdan hanane, à mes collègues du laboratoire antibiotiques, antifongiques, physico-chimie synthèse et activité biologique «LAPSAB», aux techniciennes et à toute personne ayant participées de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous mes enseignants durant mon cursus universitaire, en particulier Mr Rahmoun MN., Mme Kazi-Tani Z., Mme Sari L., Mme Belkacem N., Mme Dali M., Mme Loukidi B., Mme Benmansour., Mme Benyelles., Mme Chaouche-Hadouchi F., Melle Mezouair D., Mr Gaour S., Mr Boucherit K.

Dédicaces

Je dédie ce travail à:

*Mes très chers parents (**Hocine et khadidja**) ; sans votre affection, vos conseils, vos sacrifices, vos encouragements, vos prières et vos efforts que vous avez déployés durant toute ma vie, ce travail n'aurait jamais pu être réalisé. Je vous présente ma pleine gratitude et mon profond respect, j'espère que Dieu vous donne la longue vie et la bonne santé, je vous aime énormément.*

*Ma grande mère **Fatma**, et à ma tante **Aicha** et son mari **Moussa**, j'espère que Dieu vous garde.*

*Mes très chères soeurs (**Wahiba et Fatima**) je vous souhaite une longue vie et bonne santé.*

*Mes deux chers frères (**Riad et Yahia**), j'espère que Dieu vous garde.*

*Mes précieuses soeurs et cousines **Amina, Hadjer, Atika, Khadidja, Fatima, Sarah, Nour El Houda** Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.*

*Mes chères nièces **Sabrina, Hidayet, Ines, Nourhane** et mes chers neveux **Hocine, Aladin et Mohammed yacine**. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.*

*A mon beau frère **Lahcen**, j'espère que Dieu vous garde*

Mes oncles, tantes, et à toute ma famille.

ملخص

نبته *Mentha pulegium* ونبته *Santolina chamaecyparissus* نوعان من النباتات الطبية، تستخدمان على نطاق واسع في الطب التقليدي لعلاج العديد من الأمراض. يركز هذا العمل على الدراسة الكيميونباتية و البحث عن الأنشطة البيولوجية لمستخلصات الخام الهيدروميثانولية المستخرجة من الجزء العلوي للنبتين و جزئياتهما الغنية بالمركبات الفينولية (إثير ثنائي الإيثيل، أسيتات الإيثيل و ن-بتانول) . تم إجراء تحليل التركيب الكيميونباتي للجزئيات الغنية بالمركبات الفينولية لنبته *M. pulegium* و *S.chamaecyparissus* باستخدام الفصل الكروماتوغرافي على الإستبانة RP-HPLC-PDA كما تم تحديد إختبار إنحلال الدم من أجل دراسة سمية المستخلصات و جزئياتها المختلفة على كريات الدم الحمراء البشرية تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة بطرق تعتمد على نقل ذرة الهيدروجين و نقل الإلكترون الفردي. بالإضافة إلى ذلك تم إجراء تقييم الأنشطة المضادة لإنحلال الدم بعد وضع كريات الدم الحمراء مع مستخلصات النبتتين بتركيزات مختلفة في وجود AAPH بينما تمت دراسة النشاط المضاد لمرض السكري للمستخلصات من خلال تقييم قدرتهم المثبطة لإنزيمات ألفا أميلاز و ألفا غلوكوزيداز مع إجراء تقييم نشاط مضادات لإرتباط السكر بالبروتين. كما تم تقدير النشاط المثبط للإنزيم أستيل كولين استيراز (AChE) و البيتيريل كولين استيراز (BChE) . أظهرت النتائج المتحصل عليها فيما يتعلق بإختبار إنحلال الدم أن جميع المستخلصات ليست سامة على الكريات الدموية الحمراء البشرية باستثناء مستخلصات الخام الهيدروميثانولية التي أظهرت مستويات سمية ضئيلة عند تركيز 200 مغ / مل، في حين أظهر جزء أسات الإيثيل للمستخلص الهيدروميثانولي للنبتين قدرة عالية في إرجاع الجذور الحرة ، في إرجاع الحديد و الزنك، في تثبيط تبيض البيتاكاروتين و كمضاد فعال لإنحلال الدم . كما أظهر جزء أسات الإيثيل قوة كبيرة مضادة لإرتباط السكر بالبروتينات و مثبطة لنشاط الإنزيم ألفا أميلاز ($Cl_{50} = 0,11 \pm 16,37$ ميكروغرام /مل بالنسبة لنبته *M. pulegium* و $Cl_{50} = 0,41 \pm 13,73$ ميكروغرام /مل بالنسبة لنبته *S. chamaecyparissus*) ألفا غلوكوزيداز ($Cl_{50} = 1,69 \pm 61,85$ ميكروغرام /مل بالنسبة لنبته *M. pulegium* و $Cl_{50} = 0,16 \pm 15,62$ ميكروغرام /مل بالنسبة لنبته *S. chamaecyparissus*) أستيل كولين استيراز ($Cl_{50} = 0,05 \pm 3,13$ ميكروغرام /مل بالنسبة لنبته *M. pulegium* و $Cl_{50} = 0,00 \pm 7,82$ ميكروغرام /مل بالنسبة لنبته *S.chamaecyparissus*) و بوتيريل كولين استيراز ($Cl_{50} = 0,20 \pm 12,97$ ميكروغرام /مل بالنسبة لنبته *M. pulegium* و $Cl_{50} = 0,45 \pm 7,25$ ميكروغرام /مل بالنسبة لنبته *S. chamaecyparissus*). هذه الأنشطة أعلى من الأكاربوز و الجالونتامين المستخدمة كأدوية موحدة. كشف التحليل الكروماتوغرافي على وجود حمض غاليك، حمض بي كوماريك، حمض الفيروليك، روتين، كيرسنين، و نارنجينين في هذا الجزء. تشير هذه النتائج إلى أن *M. pulegium* و *S. chamaecyparissus* مصدر غني بمضادات الأكسدة و التي يمكن أن تكون مفيدة للوقاية و العلاج من الأمراض المرتبطة بالإجهاد التأكسدي بما في ذلك داء السكري و مرض الزهايمر.

الكلمات المفتاحية: *M. pulegium* و *S. chamaecyparissus*، مركبات فينولية، RP-HPLC-PDA، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للدم، نشاط مضاد لمرض السكري ، نشاط مضاد لمرض الزهايمر.

Résumé

Mentha pulegium et *Santolina chamaecyparissus* sont deux plantes médicinales, largement utilisées en pharmacopée traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies. Ce travail porte sur l'étude phytochimique et la recherche des activités biologiques des extraits bruts hydrométhanoliques obtenus de la partie aérienne des deux plantes et leurs fractions riches en composés phénoliques (éther diéthylique, acétate d'éthyle et n-butanol). L'analyse du profil phytochimique des fractions riches en composés phénoliques de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* a été effectuée à l'aide d'une chromatographie liquide à haute performance RP-HPLC-PDA. En outre, le test d'hémolyse a été réalisé *in vitro*, afin d'étudier la toxicité des différents extraits et fractions vis-à-vis des érythrocytes humaines. L'activité antioxydante a été évaluée par différentes méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène et le transfert d'électron singulier : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), [2,2'-azino-bis (acide 3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] (ABTS), radical galvinoxyle (GOR), radical superoxyde, la PAOT-liquide®, la capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC), pouvoir réducteur du fer, phénanthroline, et blanchissement du β -carotène. L'évaluation de l'activité anti-hémolytique a été réalisée par la mise en contact des globules rouges préalablement incubés avec les extraits à différentes concentrations en présence de AAPH (2,2'-azobis(2-aminodipropane, dihydrochloride). Tandis que l'activité antidiabétique des extraits a été étudiée *in vitro* en évaluant leurs pouvoirs inhibiteurs vis-à-vis de l' α -amylase et de l' α -glucosidase. L'évaluation de l'activité antiglycation a été également réalisée. Enfin, l'inhibition du cholinestérase a été évaluée vis-à-vis de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Les résultats obtenus ont montré que l'ensemble des extraits ne sont pas toxiques vis-à-vis des érythrocytes humaines à l'exception des extraits bruts hydrométhanoliques qui ont présenté une faible toxicité à la concentration de 200 mg/ml. La fraction acétate d'éthyle, la plus riche en composés phénoliques, des deux plantes étudiées, a présenté un potentiel intéressant du piégeage des radicaux libres (DPPH, ABTS, GOR, superoxyde), de réduction du fer et du cuivre, d'inhibition de blanchissement du β -carotène et un effet anti-hémolytique le plus puissant. La fraction acétate d'éthyle a enregistré également la meilleure activité antiglycation et a exercé les activités inhibitrices les plus élevées vis-à-vis de l' α -amylase ($CI_{50} = 16,37 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$ pour *M. pulegium* et $CI_{50} = 13,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ pour *S. chamaecyparissus*) de l' α -glucosidase ($CI_{50} = 61,85 \pm 1,69 \mu\text{g/ml}$ pour *M. pulegium* et $CI_{50} = 15,62 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$ pour *S. chamaecyparissus*), de l'AChE ($CI_{50} = 3,13 \pm 0,05 \mu\text{g / ml}$ pour *M. pulegium* et $CI_{50} = 7,82 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$ pour *S.chamaecyparissus*) et de la BChE ($CI_{50} = 12,97 \pm 0,20$ pour *M. pulegium* et $CI_{50} = 7,25 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$ pour *S. chamaecyparissus*). Ces activités sont supérieures à celles de l'Acarbose et de la Galantamine utilisés comme médicaments standard. L'analyse chromatographique a révélé la présence de l'acide gallique, l'acide *p*-coumarique, l'acide férulique, la rutine, la naringénine et la quercétine dans cette fraction. Ces résultats montrent que *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* constituent une source prometteuse d'antioxydants, qui pourraient être utiles dans la prévention et les thérapies des maladies associées au stress oxydatif, y compris le diabète sucré et la maladie d'Alzheimer.

Mots clés : *M. pulegium*, *S. chamaecyparissus*, composés phénoliques, RP-HPLC-PDA, activité antioxydante, activité anti-hémolytique, activité antidiabétique, activité anti-Alzheimer.

Abstract

Mentha pulegium and *Santolina chamaecyparissus* are two medicinal plants, widely used in traditional pharmacopoeia to treat many diseases. This work focused on the phytochemical study and the search for biological activities of the hydromethanolic crude extracts obtained from the aerial part of the two plants and their fractions rich with phenolic compounds (diethyl ether, ethyl acetate and n-butanol). The analysis of the phytochemical profile of the extracts of *M. pulegium* and *S. chamaecyparissus* was carried out using a high-performance liquid chromatography RP-HPLC-PDA. The in vitro hemolytic test was used to measure the toxicity of the different extracts and fractions on human erythrocytes. The antioxidant activity was evaluated by methods based on hydrogen atom transfer and singular electron transfer; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (ABTS), galvinoxyl radical (GOR), superoxide radical, liquid-PAOT®, copper reducing antioxidant capacity (CUPRAC), ferric reducing activity, phenanthroline and β -carotene bleaching. The evaluation of the anti-hemolytic activity was carried out by contacting the human red blood cells with the extracts at different concentrations tested in the presence of AAPH (2,2-azobis(2-aminodipropene, dihydrochloride). The antidiabetic activity of the extracts was studied in vitro by evaluating their ability to inhibit α -amylase and α -glucosidase. The evaluation of the antiglycation was also carried out. Finally, the inhibition of cholinesterase was estimated by two enzymes acetylcholinesterase (ACHE) and butyrylcholinesterase (BChE). The results obtained showed that all the extracts are not toxic to human erythrocytes with the exception of the crude hydromethanolic extracts which showed low toxicity at a concentration of 200 mg/ml. The ethyl acetate fraction, the richest in phenolic compounds of the two plants studied, had an interesting potential for trapping free radicals (DPPH, ABTS, GOR, superoxide), reducing iron and copper, β -carotene bleaching inhibition and the most powerful anti-hemolytic effect. The ethyl acetate fraction also recorded the best antiglycation activity and exercised the highest inhibitory activities of α -amylase ($IC_{50} = 16,37 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$ for *M. pulegium* and $IC_{50} = 13,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ for *S. chamaecyparissus*) α -glucosidase ($IC_{50} = 61,85 \pm 1,69 \mu\text{g/ml}$ for *M. pulegium* and $IC_{50} = 15,62 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$ for *S. chamaecyparissus*), AChE ($IC_{50} = 3,13 \pm 0,05 \mu\text{g / ml}$ for *M. pulegium* and $IC_{50} = 7,82 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$ for *S. chamaecyparissus*) and of the BChE ($IC_{50} = 12,97 \pm 0,20$ for *M. pulegium* and $IC_{50} = 7,25 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$ for *S. chamaecyparissus*), its activity was higher than that of Acarbose and Galantamine used as standard drugs. Chromatographic analysis revealed the presence of gallic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, rutin, naringenin and quercetin in this fraction. These results show that *M. pulegium* and *S. chamaecyparissus* are a promising source of antioxidants, which could be useful in the prevention and therapies of diseases associated with oxidative stress, including diabetes mellitus and Alzheimer's disease.

Key words: *M. pulegium*, *S. chamaecyparissus*, phenolic compounds, RP-HPLC-PDA, antioxidant activity, anti-hemolytic activity, antidiabetic activity, anti-Alzheimer activity.

Liste des tableaux

Tableau 1. Différents types des espèces réactives	3
Tableau 2. Principaux rôles physiologiques des radicaux libres et ses dérivés	4
Tableau 3. Les principaux ADO utilisés dans le traitement du diabète de type 2, leurs mécanismes d'action, leurs effets indésirables et leurs contre indications	11
Tableau 4. Propriétés biologiques de quelques métabolites secondaires	15
Tableau 5. Caractéristiques des extraits bruts hydrométhanoliques de la partie aérienne de <i>Mentha pulegium</i> et <i>Santolina chamaecyparissus</i> et de leurs fractions obtenues.	39
Tableau 6. Screening phytochimique de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i> et ses fractions obtenues.....	40
Tableau 7. Screening phytochimique de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i> et ses fractions obtenues.....	41
Tableau 8 : Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des extraits de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i> et de <i>S. chamaecyparissus</i>	43
Tableau 9. Les CI ₅₀ (µg/ml) des différents extraits de <i>M. pulegium</i> et de <i>S. chamaecyparissus</i> , obtenues par méthode de DPPH.....	49
Tableau 10. Les CI ₅₀ (µg/ml) des différents extraits de <i>M. pulegium</i> et de <i>S. chamaecyparissus</i> , obtenues par méthode de ABTS•+.....	51
Tableau 11. Les CI ₅₀ (µg/ml) des différents extraits de <i>M. pulegium</i> et de <i>S. chamaecyparissus</i> , obtenues par méthode du piégeage du radical galvinoxyl.	53
Tableau 12. Les CI ₅₀ (µg/ml) des différents extraits de <i>M. pulegium</i> et de <i>S. chamaecyparissus</i> , obtenues par méthode de piégeage de radical superoxyde O ₂ •-	55
Tableau 13. Les A _{0,5} (µg/ml) des différents extraits de <i>M. pulegium</i> et de <i>S. chamaecyparissus</i> , obtenues par méthode de CUPRAC	59

Tableau 14. Les $A_{0,5}$ ($\mu\text{g/ml}$) des différents extraits de <i>M. pulegium</i> et de <i>S. chamaecyparissus</i> , obtenues par méthode de FRAP	61
Tableau 15. Les $A_{0,5}$ ($\mu\text{g/mL}$) des différents extraits de <i>M. pulegium</i> et de <i>S. chamaecyparissus</i> , obtenues par méthode de phénanthroline.	63
Tableau 16 : Les CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) des différents extraits de <i>M. pulegium</i> et de <i>S. chamaecyparissus</i> par méthode de blanchissement du β -carotène.	66
Tableau 17. Temps de demi-hémolyse (HT_{50} min) pour les extraits de <i>M. pulegium</i>	67
Tableau 18. Temps de demi-hémolyse (HT_{50} min) pour les extraits de <i>S. chamaecyparissus</i>	68
Tableau 19. Les CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) des différents extraits de <i>M. pulegium</i> et de <i>S. chamaecyparissus</i>	76

Liste des Figures

Figure 1: Complications du diabète sucré.....	7
Figure 2 : Mécanisme d'action des médicaments antidiabétiques oraux	8
Figure 3: <i>Mentha pulegium</i> L.....	16
Figure 4 : <i>S. chamaecyparissus</i> (feuilles et sommités fleuries)	18
Figure 5: L'échelle PAOT-Score Scale ®, Ingrédients	30
Figure 6: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	42
Figure 7: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	42
Figure 8: Chromatogramme de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique de <i>M. pulegium</i> préparé par macération.....	44
Figure 9 : Chromatogramme de la fraction n-butanol de l'extrait brut hydrométhanolique de <i>M. pulegium</i> préparé par macération.....	44
Figure 10: Chromatogramme de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique de <i>S. chamaecyparissus</i> préparé par macération.....	45
Figure 11 : Chromatogramme de la fraction n-butanol de l'extrait brut hydrométhanolique <i>S. chamaecyparissus</i> préparé par macération	45
Figure 12: Taux d'hémolyse après 60 min d'incubation d'une suspension érythrocytaire à 37°C en présence des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i> préparé par macération et ses fractions.	46
Figure 13: Taux d'hémolyse après 60 min d'incubation d'une suspension érythrocytaire à 37°C en présence des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i> préparé par macération et ses fractions.	47
Figure 14: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	48

Figure 15: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH [·] en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne <i>S. chamaecyparissus</i>	49
Figure 16: Pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS ^{•+} en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	50
Figure 17: Pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS ^{•+} en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	51
Figure 18: Pourcentages d'inhibition du radical galvinoxyl en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	52
Figure 19: Pourcentages d'inhibition du radical galvinoxyl en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	53
Figure 20: Pourcentages d'inhibition du radical superoxyde en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	54
Figure 21: Pourcentages d'inhibition du radical superoxyde en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	55
Figure 22: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI ₅₀ des différents tests antiradicalaires des différentes fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	56
Figure 23: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI ₅₀ des différents tests antiradicalaires des différentes fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	57
Figure 24: PAOT Score ® des extraits bruts hydrométhanoliques de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i> et <i>S. chamaecyparissus</i> et de leurs fractions riches en composés phénoliques.....	58
Figure 25: Capacité de réduction du cuivre en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i> (CUPRAC).	58

Figure 26: Capacité de réduction du cuivre en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i> (CUPRAC).....	59
Figure 27: Pouvoir réducteur de fer en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i> (FRAP).....	60
Figure 28: Pouvoir réducteur de fer en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i> (FRAP).....	61
Figure 29: Test de l'activité antioxydante par la méthode de Phénanthroline de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	62
Figure 30: Test de l'activité antioxydante par la méthode de Phénanthroline de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	63
Figure 31: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les A _{0,5} des différents tests antioxydants des différentes fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	64
Figure 32: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les A _{0,5} des différents tests antioxydants des différentes fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	64
Figure 33: Pourcentages d'inhibition de blanchissement du β-carotène en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	65
Figure 34: Pourcentages d'inhibition de blanchissement du β-carotène en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	66
Figure 35: Pourcentages d'inhibition de l'α-amylase en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	69
Figure 36: Pourcentages d'inhibition de l'α-amylase en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>S.chamaecyparissus</i>	69

Figure 37: Valeurs des CI_{50} de l'inhibition de l' α - amylase de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de <i>M.pulegium</i> (A) et <i>S.chamaecyparissus</i> (B) et ses fractions obtenues en comparaison avec la valeur CI_{50} de l'Acarbose	70
Figure 38: Pourcentages d'inhibition de l' α -glucosidase en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	71
Figure 39: Pourcentages d'inhibition de l' α -glucosidase en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de <i>S.chamaecyparissus</i>	72
Figure 40: Valeurs des CI_{50} de l'inhibition de l' α -glucosidase de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de <i>M.pulegium</i> (A) et de <i>S.chamaecyparissus</i> (B) et ses fractions obtenues en comparaison avec la valeur CI_{50} de l'Acarbose	73
Figure 41: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI_{50} des différents tests d'activité inhibitrice de l' α -amylase et de l' α -glucosidase des différents extraits et fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	74
Figure 42: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI_{50} des différents tests d'activité inhibitrice de l'alpha-amylase et de l'alpha-glucosidase des différentes fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	74
Figure 43: Pourcentages d'inhibition de glycation en fonction de différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération, et ses fractions de la partie aérienne de <i>M.pulegium</i>	75
Figure 44: Pourcentages d'inhibition de glycation en fonction de concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération, et ses fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	76
Figure 45: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI_{50} des différents tests d'activité antiglycation des différentes fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	77
Figure 46: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI_{50} des différents tests d'activité antiglycation des différentes fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	78
Figure 47: Pourcentages d'inhibition de l'AChE en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération, et ses fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	79

Figure 48: Pourcentages d'inhibition de l'AChE en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération, et ses fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	79
Figure 49: Valeurs des CI ₅₀ de l'inhibition de l'AChE de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de <i>M.pulegium</i> (A) et de <i>S.chamaecyparissus</i> (B) et leurs fractions obtenues en comparaison avec la valeur CI ₅₀ de la Galantamine.	81
Figure 50: Pourcentages d'inhibition de l'BChE en fonction des différentes des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération, et ses fractions de la partie aérienne de <i>M.pulegium</i>	82
Figure 51: Pourcentages d'inhibition de l'BChE en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération, et ses fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	82
Figure 52: Valeurs des CI ₅₀ de l'inhibition de l'BChE de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de <i>M.pulegium</i> (A) et de <i>S.chamaecyparissus</i> (B) et leurs fractions obtenues en comparaison avec la valeur CI ₅₀ de la Galantamine.	83
Figure 53: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI ₅₀ des différents tests d'inhibition de l'AChE et de l' BChE des différentes fractions de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i>	84
Figure 54: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI ₅₀ des différents tests d'inhibition de l'AChE et de l' BChE des différentes fractions de la partie aérienne de <i>S. chamaecyparissus</i>	85

Liste des abréviations

- AAPH : 2,2'-azobis(2-aminodipropane) dihydrochloride
- ABTS : 2,20-azinobis-3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic acid.
- APG : Angiosperms Phylogeny group
- ACh : Acétylcholine
- AChE : Acetylcholinesterase
- ADA : Association Américaine du Diabète
- ADO : Antidiabétiques oraux
- AGE : Advanced Glycation End products
- ATP : Adénosine tri phosphate
- BChE : Butyrylcholinesterase
- BSA : Bovine Serum Albumin
- CUPRAC: cupric-reducing antioxidant capacity
- DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- DTNB: 5, 5'-dithio-bis acide 2-nitrobenzoïque
- ERO : Espèces réactives de l'oxygène
- ERN : Espèces réactives de l'azote
- NBT: nitro-blue- tetrazolium
- OMS : Organisation mondiale de la santé
- PAOT : Pouvoir Antioxydant Total
- p-NPG : p-nitrophenyl- α -D-glucoopyranoside
- RP-HPLC-PDA : Reverse Phase- High Performance Liquid Chromatography- Photo Diode Array
- RLs : radicaux libres

Table des matières

Introduction	01
Synthèse bibliographique	03
<i>Matériel et méthodes</i>	
I. Matériel végétal.....	20
1. Préparation des plantes.....	20
2. Préparation des extraits bruts hydrométhanoliques et leurs fractions.....	20
3. Calculs des rendements	21
II. Etude phytochimique.....	21
1. Tests phytochimiques.....	21
2. Dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes totaux).....	23
2.1.Dosage des polyphénols totaux.....	23
2.2.Dosage des flavonoïdes totaux.....	23
3. Identification des composés phénoliques par RP- HPLC-DAD.....	24
III. Etude biologique.....	25
1. Evaluation de la cytotoxicité des extraits vis-à-vis des globules rouges (Test d'hémolyse).....	26
2. Evaluation de l'activité antioxydante	26
2.1. Piégeage du radical DPPH [·]	26
2.2.Piégeage du radical ABTS ^{·+}	27
2.3. Piégeage du radical galvinoxyl (GOR).....	28
2.4. Piégeage de l'anion superoxyde.....	28
2.5.Test PAOT-Liquide ®.....	29
2.6. La capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	30
2.7. Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	31
2.8. pouvoir réducteur du fer (méthode de Phénanthroline).....	32
2.9. blanchissement du β -carotène.....	32
3. Evaluation de l'activité anti-hémolytique.....	33
4. Evaluation de l'activité antidiabétique.....	34

4.1. Recherche de l'activité inhibitrice de l' α -amylase.....	34
4.2. Recherche de l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase	35
4.3. Activité antiglycation (recherche d'effet antiglycant).....	36
5. Evaluation de l'activité anti-Alzheimer.....	37
5.1. Recherche d'activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE).....	37
6. Analyses statistiques.....	38

Résultats et interprétations

I. Caractéristiques des extraits préparés.....	39
II. Etude phytochimique.....	40
1. Tests phytochimiques.....	40
2. Dosage des composés phénoliques	41
3. Identification des composés phénoliques par RP- HPLC-PDA.....	43
III. Etude biologique.....	46
1. Evaluation de la cytotoxicité des extraits vis-à-vis des globules rouges.....	48
2. Evaluation de l'activité antioxydante.....	48
2.1. Piégeage du radical DPPH [•]	48
2.2. Piégeage du radical cationique ABTS ^{•+}	50
2.3. Piégeage du radical galvinoxyl (GOR).....	52
2.4. Piégeage du radical superoxyde (O ₂ ^{•-}).....	54
2.5. Test PAOT-Liquide ®.....	57
2.6. Pouvoir réducteur du cuivre (CUPRAC).....	58
2.7. Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	60
2.8. Pouvoir réducteur du fer (Phénanthroline).....	62
2.9. Inhibition de blanchissement du β -carotène.....	65
3. Activité anti-hémolytique	67
4. Activité antidiabétique.....	68
4.1. Activité inhibitrice de l' α -amylase	68
4.2. Activité inhibitrice de l' α -glucosidase.....	71
4.3. Activité antiglycation.....	75

5. Activité anti-Alzheimer.....	78
5.1. Activité inhibitrice vis-à-vis de l'acétylcholinestérase (AChE).....	78
5.2. Activité inhibitrice vis-à-vis de la butyrylcholinestérase (BChE).....	81
Discussion	86
Conclusion et perspectives	102
Références bibliographiques	104

Introduction

Les radicaux libres (ERO/ERN) jouent un rôle important dans le processus d'oxydation, ce qui conduit à l'initiation et à la progression de diverses maladies chroniques non transmissibles telles que les maladies cardiovasculaires et inflammatoires, le cancer, la cataracte, le diabète sucré et la maladie d'Alzheimer (**Bahadori et al., 2017 ; Asghari et al., 2018**).

Le diabète sucré est l'une des maladies non transmissibles les plus répandues dans le monde, il a atteint des proportions alarmantes; près d'un demi-milliard de personnes dans le monde vivent avec le diabète. Actuellement, chaque année 3,2 millions de personnes dans le monde meurent des complications associées au diabète nécessitant l'importance de poursuivre la recherche pour le développement de nouvelles méthodes à la fois pour prévenir et traiter cette maladie (**Vinayagam et al., 2016 ; FID, 2019**). L'une des approches thérapeutiques pour traiter le diabète de type 2 consiste à diminuer l'hyperglycémie postprandiale en ralentissant l'absorption intestinale du glucose par l'inhibition de l' α -amylase et l' α -glucosidase (**Asgar, 2013 ; Lordan et al., 2013 ; Ceylan et al., 2016**).

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par la détérioration progressive de la mémoire et d'autres fonctions cognitives (**Chen et al., 2018**). En 2019, les données épidémiologiques révèlent qu'il y a plus de 50 millions de personnes touchées dans le monde et ce nombre pourrait atteindre 152 millions d'ici 2050 (**ADI, 2019**). L'une des principales approches thérapeutiques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer consiste à augmenter les taux d'acétylcholine (ACh) dans le cerveau à l'aide d'inhibiteurs de la cholinestérase. Ces derniers bloquent les fonctions d'AChE (acétylcholinestérase) et de BChE (butyrylcholinestérase) qui sont les enzymes hydrolytiques de l'ACh (**Zengin et al., 2015 ; Bahadori et al., 2016 ; Feng et al., 2017**).

L'utilisation des molécules pharmaceutiques de synthèse pour le traitement du diabète sucré et de la maladie d'Alzheimer présentent des effets secondaires qui limitent leur utilisation clinique et nécessitent la recherche de nouvelles molécules naturelles plus efficaces et moins ou non toxiques (**Hyun et al., 2014 ; Alqahtani et al., 2020 ; Riaz et al., 2020**).

Les plantes médicinales sont une source de divers composés bioactifs appelés métabolites secondaires qui présentent un large éventail de propriétés pharmacologiques, notamment anti-inflammatoire, anticancéreuse, antioxydante, antidiabétique et anti-Alzheimer (**Bahadori et al., 2017 ; Asghari et al., 2018**).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 80% de la population mondiale ont recours à la médecine traditionnelle à base de plantes en tant que soins de santé primaire (**OMS, 2000 ; Bouzabata et Yavuz, 2019**). Les plantes médicinales suscitent un intérêt

croissant dans la recherche scientifique à l'échelle mondiale. Il existe environ 50000 à 70000 espèces végétales utilisées dans la phytothérapie à travers le monde (Ilbert et al., 2016).

L'Algérie possède l'une des flores les plus diversifiées du bassin méditerranéen. Cette flore regroupe environ 3744 espèces végétales dont 125 espèces sont largement utilisées en médecine traditionnelle sans aucune valorisation scientifique en phytochimie ainsi qu'en pharmacologie (Quezel et Santa, 1963 ; Halimi, 2014 ; Miara et al., 2019).

Dans le cadre de la valorisation des propriétés thérapeutiques des plantes médicinales de la flore algérienne et la recherche de nouvelles molécules bioactives, le présent travail porte sur la caractérisation du profil phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante, antidiabétique et anti-Alzheimer des extraits bruts hydrométhanoliques et leurs fractions riches en composés phénoliques, préparés à partir de la partie aérienne des deux plantes médicinales et aromatiques: *Mentha pulegium L.* (Lamiacées), communément appelé Fliou, et *Santolina chamaecyparissus L.* (Astéracées), connue sous le nom de Jaada. Ces deux espèces sont très répandues dans la région méditerranéenne et utilisées dans divers industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Da Silva, 2004 ; Rodrigues et al., 2013 ; Khonche et al., 2017 ; Kelidari et al., 2021).

La méthodologie de cette étude se résume dans les points suivants :

1. Préparation des extraits bruts hydrométhanoliques et des fractions riches en composés phénoliques de la partie aérienne de *Mentha pulegium L.* et de *Santolina chamaecyparissus L.* ;
2. Screening phytochimique des différents extraits préparés des plantes étudiées et dosage quantitative des composés phénoliques: polyphénols totaux et flavonoïdes totaux ;
3. Séparation et identification des fractions riches en composés phénoliques par une analyse RP-HPLC-PDA (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography-Photo Diode Array) ;
4. Etude de la toxicité : recherche d'effet hémolytique vis-à-vis des globules rouges humains ;
5. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro* par différentes méthodes ;
6. Evaluation de l'activité antidiabétique : recherche d'effet inhibiteur vis-à-vis de l' α -amylase et de l' α -glucosidase et recherche de l'activité antiglycation ;
7. Evaluation de l'activité anti-Alzheimer : recherche d'effet inhibiteur vis-à-vis de l'acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE).

Synthèse

bibliographique

Le stress oxydatif est un processus physiopathologique dans lequel la génération des radicaux libres dépasse les défenses antioxydantes. Il se traduit par la formation excessive ou la suppression insuffisante des radicaux libres (RLs) résultant, soit d'un manque de capacité antioxydante, soit d'une surabondance des RLs (**Persson et al., 2014 ; Pisoschi et Pop, 2015**).

Les RLs sont des espèces chimiques qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires sur leurs couches périphériques, rendant ainsi ces espèces particulièrement instables (**Durand et al., 2013**). Ils sont très réactifs et répartis en espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui comprennent des dérivées radicalaires comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), et certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et en espèces réactives de l'azote (ERN) qui dérivent de l'oxyde nitrique ou le monoxyde d'azote (NO) (**Tableau 1**) (**Sosa et al., 2013 ; Pisoschi et Pop, 2015 ; Weidinger et Kozlov, 2015**).

Tableau 1. Différents types des espèces réactives (**Gutowski et Kowalczyk, 2013**)

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}	Oxygène singulet	1O_2
Radical alkoxyde	RO^{\cdot}	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}	Peroxynitrite	ONOO

Les sources de ces radicaux libres sont très variées, elles peuvent avoir diverses origines, soit exogène tel que des facteurs environnementaux comme l'exposition prolongée au soleil, les irradiations (ultraviolets, ionisants), le tabagisme, la consommation excessive d'alcool et de médicaments, le contact avec des agents cancérigènes, la pollution, les réactifs chimiques, les solvants industriels, soit endogène comme la chaîne de transport des électrons dans les mitochondries, les phénomènes inflammatoires chroniques ou aigues (**Franco et al., 2009 ; Pickering et al., 2013**).

En fonction de leur concentration, les RLs peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique. A faibles concentrations, les RLs ont des fonctions physiologiques importantes qui peuvent être résumées dans le Tableau 02.

Tableau 2. Principaux rôles physiologiques des radicaux libres et ses dérivés (**Dröge, 2002 ; Favier, 2003**)

Espèce	Rôle physiologique
Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Transduction du signal ; ➤ Relaxation du muscle lisse ; ➤ Activation du facteur nucléaire (NF-κB) responsable de l'expression du gène de l'interleukine 2 (IL-2) ; ➤ Activation de la protéine kinase C ; ➤ Induction et exécution du phénomène d'apoptose.
Espèces réactives de l'azote (ERN)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Inhibition de l'agrégation plaquettaire ; ➤ Régulation des voies de transduction du signal ; ➤ Stimulation de la production de protéines anti-apoptotiques ; ➤ Activation des MAPK des cellules endothéliales et monocytes.

Lorsque la production des RLs (ERO et ERN) est trop élevée et dépasse les défenses antioxydantes de l'organisme, leurs effets deviennent délétères pour les cellules et diverses fonctions physiologiques. Ils provoquent ainsi des altérations irréversibles des macromolécules (Oxydation d'ADN, des protéines et des lipides) (**Favier, 2003 ; Sanchez, 2017 ; Ighodaro et Akinloye, 2018**).

L'oxydation peut endommager l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial par oxydation des bases nucléotidiques (bases puriques et pyrimidiques) ainsi que la repture du squelette désoxyribose en provoquant la coupure des brins (**Favier et al., 2003 ; Burton et Jauniaux, 2011 ; Charbon et al., 2014**). Ces modifications sont à l'origine d'un arrêt d'induction de la transcription, à des erreurs de réplication et à une instabilité génomique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (**Favier et al., 2003 ; Zhang et al., 2013**).

Les protéines sont également sensibles à l'oxydation par les RLs. Cette oxydation touche la chaîne latérale de certains acides aminés constitutifs des protéines notamment les acides aminés soufrés et aromatiques. Les protéines exposées au phénomène d'oxydation deviennent très hydrophobes, soit par suppression des groupements amines ionisables, soit par extériorisation des zones hydrophobes centrales. Ces modifications sont irréparables et font perdre aux protéines leurs propriétés biologiques, en particulier leurs activités enzymatiques et deviennent beaucoup

plus sensibles à l'action des protéases (**Davis et al., 2001 ; Důračková, 2008 ; Rahal et al., 2014**).

Les lipides dont les acides gras polyinsaturés et les phospholipides membranaires représentent également la cible privilégiée de l'attaque radicalaire, notamment par le radical hydroxyle (OH[•]) qui est capable d'arracher un atome hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy, ce qui provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète (**Favier et al., 2003 ; Miwa et al., 2008 ; Cotticelli et al., 2013**).

Les dommages oxydatifs induits par les RLs contribuent à la pathogenèse et à la pathophysiologie de différentes maladies, principalement les maladies neurodégénératives (Alzheimer et Parkinson), les maladies cardiovasculaires, le cancer et le diabète sucré (**Toda, 2011; Maulik et al., 2013 ; Rabiei et al., 2019**).

Selon l'OMS, le diabète sucré 7^{ème} cause de décès dans le monde, est un trouble endocrinien et métabolique, caractérisé par une hyperglycémie chronique résultant d'une carence en insuline ou une insensibilité à l'insuline ou une combinaison entre les deux anomalies. Il affecte le métabolisme normal des glucides, des lipides et des protéines, déclenchant de nombreux changements dans le système biochimique du corps (**OMS, 2016 ; Stojkovic et al., 2019**).

En 2017, la fédération internationale du diabète (FID) a déclaré que le diabète sucré a causé 4 millions de décès dans le monde. Selon la fédération internationale du diabète (**FID**) (**2019**), le nombre des diabétiques dans le monde est estimé à 463 millions de personnes. Ce nombre est supposé dépasser 578 millions en 2030 et 700 millions en 2045 (**Basit et al., 2018**).

En Algérie, le diabète sucré occupe la deuxième place parmi les maladies chroniques non transmissibles les plus fréquentes (**FID, 2017**). Les données épidémiologiques ont enregistré une augmentation de 80% entre 2003 et 2017 avec une prévalence de 8,9% de diabétiques soit de plus de 4,5 millions des cas diabétiques (**FID, 2019**).

Selon l'ADA, (2014), il existe quatre types de diabète, le diabète de type 1, le diabète de type 2, le diabète gestationnel et autres formes de diabète, dans lesquels les facteurs génétiques et environnementaux peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse de ces types de diabète (**Skyler et al., 2017**).

Le diabète de type 1 (DT1), également connu sous le nom de diabète insulino-dépendant, représente 5 à 10% des diabétiques, résultant d'un dysfonctionnement des cellules β

pancréatiques, d'une réduction de la libération d'insuline et d'une diminution des taux d'insuline circulatoire (ADA, 2014). Cette forme de diabète se manifeste le plus souvent chez l'enfant et l'adolescent (Ozturk et al., 2018). La physiopathologie du DT1 est dominée par la destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, ce qui conduit à une dépendance à l'insuline exogène (OMS, 2016 ; FID, 2019). La symptomatologie clinique apparaît lorsque plus de 80% de ces cellules sont détruites et l'insulinémie devient insuffisante pour maintenir la glycémie normale (Perlemuter et Morin, 2003 ; Batina et al., 2010).

Le diabète de type 2 (DT2), est la forme la plus fréquente du diabète. Il représente environ 90 à 95% des patients diabétiques. C'est une maladie non auto-immune caractérisée par une réponse inadéquate à l'insuline (sensibilité réduite à l'insuline) ou une insulino-résistance (ADA, 2014). Cette forme du diabète s'établit le plus souvent chez les personnes adultes et majoritairement en surpoids (Infante-Garcia et Garcia-Alloza, 2019). La physiopathologie du diabète de type 2 se caractérise par une phase prédiabétique (asymptomatique) et une phase diabétique (symptomatique).

Le diabète gestationnel est un autre type de diabète qui survient chez les femmes enceintes pendant la grossesse, sa prévalence est comprise entre 3 et 6%. Certains de ces états peuvent disparaître, d'autres peuvent persister, voire même s'aggraver (Monnier, 2019). Ce type de diabète est lié à une résistance à l'insuline et/ou déficit de sécrétion d'insuline et qui disparaît après l'accouchement (FID, 2019).

Les autres formes du diabète sucré sont le diabète de maturité (MODY : Maturity Onset Diabetes of the Young) qui est due à un dysfonctionnement génétique des cellules β et survenant chez l'enfant, et le diabète secondaire à diverses endocrinopathies (Marsaudon, 2011 ; FID, 2017).

Plusieurs critères sont proposés par l'association américaine du diabète (ADA, 2020) et reconnus par l'organisation mondiale de la santé (OMS) pour le diagnostic du diabète: Une glycémie à jeun $\geq 1,26$ g/l (7,0 mmol/l) vérifiée à deux reprises, une glycémie (sur plasma veineux) > 2 g/l (11,1 mmol/l) 2 heures après une charge orale de 75 g de glucose (HGPO), une glycémie postprandiale > 2 g/l et un taux d' HbA1c (hémoglobine glyquée) $\geq 6,5\%$.

L'hyperglycémie chronique est associée à un dysfonctionnement des organes et à l'apparition des complications microangiopathiques et macroangiopathiques (Figure 1). Les complications microangiopathiques touchent les petits vaisseaux sanguins. Elles se manifestent au niveau des yeux (la rétinopathie), des reins (la néphropathie) et des nerfs (la neuropathie).

Alors que les complications macroangiopathiques touchent les grosses artères du cœur et du cerveau et provoquent des accidents cardiovasculaires et cérébraux (OMS, 2016 ; FID, 2019 ; ADA, 2020).

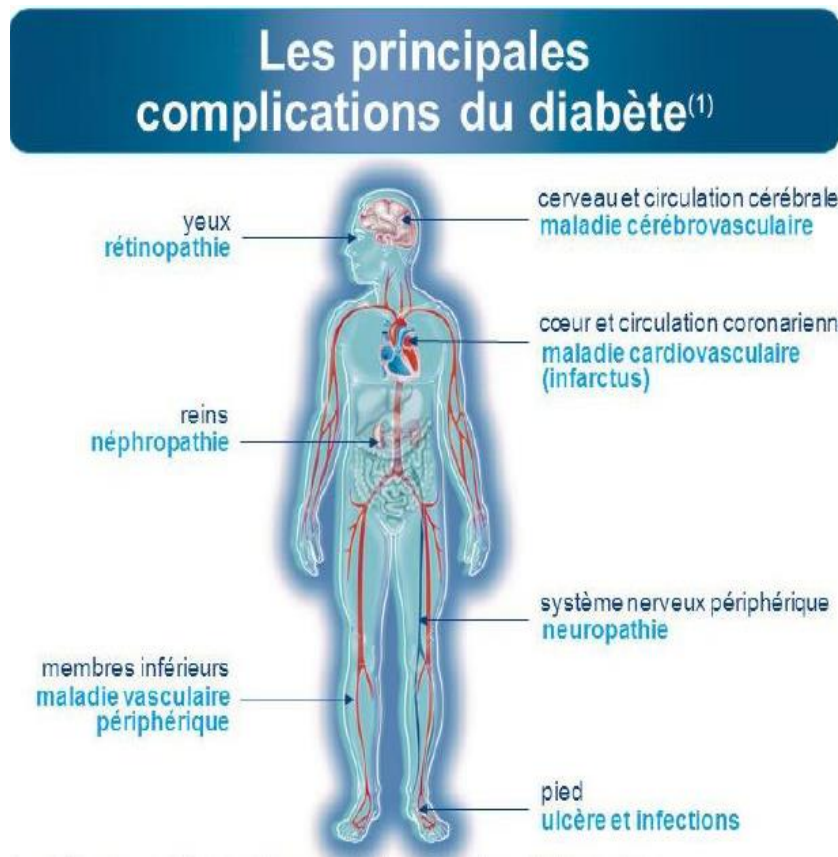


Figure 1: Complications du diabète sucré (FID, 2006)

Bien que le traitement pharmacologique soit indispensable dans la prise en charge de la majorité des états diabétiques, la plupart des recommandations ne reconnaissent que les mesures hygiéno-diététiques dont l'alimentation et l'activité physique restent l'une des bases de la thérapeutique du diabète (Monnier, 2019).

Le traitement du diabète sucré dépend du type de diabète et du degré du déficit en insuline. Pour le traitement de DT1, l'insulinothérapie reste le moyen le plus efficace pour combler la carence insulinique associée à des mesures hygiéno-diététiques (Barau et al., 2016). La transplantation d'îlots pancréatiques est une approche thérapeutique également utilisée pour le traitement de DT1 (Kessler et Moreau, 2010).

Le DT2, peut être contrôlé dans les stades précoces de la maladie par un régime alimentaire équilibré, modérément hypocalorique, riche en fibres alimentaires et en acides gras insaturés, ainsi qu'une activité physique régulière, si l'équilibre glycémique n'est pas atteint, un recours

aux médicaments antidiabétiques oraux (ADO) en association ou pas avec l'insuline est obligatoire.

Les ADO agissent par différents mécanismes d'action, comme des insulinosécréteurs, des insulinosensibilisateurs ou des ralentisseurs de l'absorption intestinale du glucose. L'arsenal des ADO comprend les sulfamides hypoglycémiantes, les glinides, les analogues du glucagon-like peptide-1 (GLP-1), les inhibiteurs de dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4), les biguanides, les inhibiteurs de transporteurs sodium-glucose de type 2 (SGLT-2) et les inhibiteurs des α -glucosidases (**figure 2**) (ADA, 2009 ; Barau et al., 2016).

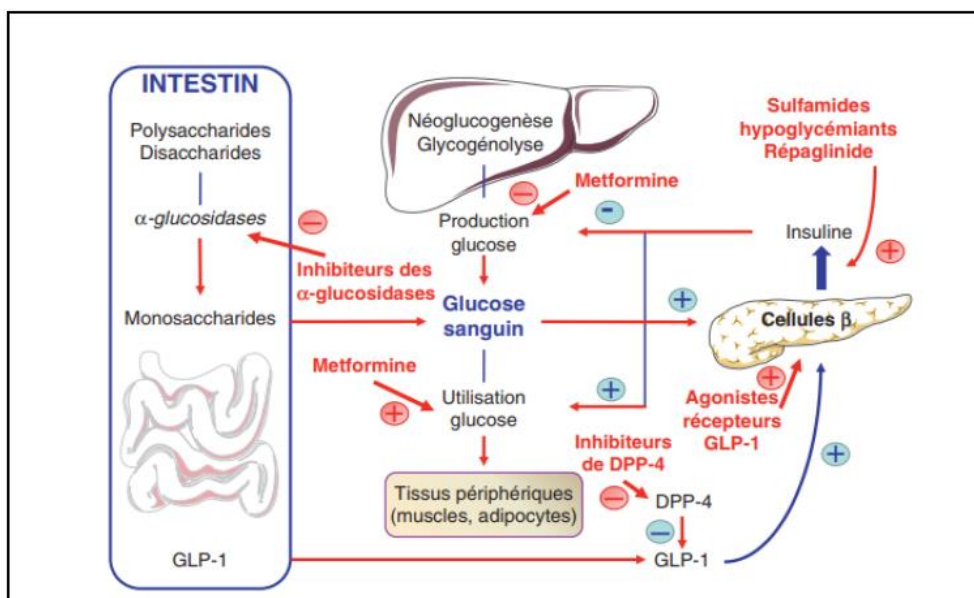


Figure 2 : Mécanisme d'action des médicaments antidiabétiques oraux (Barau et al., 2016)

Les sulfamides hypoglycémiantes stimulent la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas en les sensibilisant à l'action du glucose. Ils agissent en se fixant sur un récepteur membranaire spécifique (SUR1: *sulfonylurea receptor*) et inhibant l'efflux de K^+ de la cellule β par la fermeture des canaux potassiques adénosine triphosphate (ATP)-dépendant (Wémeau et al., 2014). L'élévation de la concentration du potassium [K^+] intracellulaire qui en résulte induit une dépolarisation cellulaire et permettant ainsi l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule β provoquée par cette ouverture conduit à l'exocytose de vésicules d'insuline vers la membrane cytoplasmique (Blicklé, 2011).

Les glinides agissent en stimulant la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas avec un mécanisme d'action similaire à celui des sulfamides hypoglycémiantes sauf que la fixation sur le récepteur SUR1 (*sulfonylurea receptor*) se fait uniquement au niveau du groupement

benzamidique, puisque ces substances ne possèdent pas le groupement sulfonyle (Barau et al., 2016).

Les analogues du glucagon-like peptide-1 (GLP-1) stimulent la sécrétion d'insuline en activant le récepteur du GLP-1 des cellules β pancréatiques d'une façon dépendante de la glycémie. Le GLP-1 est une incrétine, hormone gastro-intestinale qui stimule la sécrétion d'insuline lorsque la glycémie est trop élevée, elle augmente la néogenèse des cellules β , inhibe l'apoptose des cellules β , inhibe la sécrétion de glucagon, ralentit la vidange gastrique et induit la satiété entraînant une diminution de la glycémie postprandiale (Burcelin et Bertolini, 2013).

Les inhibiteurs de DPP-4 agissent en inhibant l'enzyme DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4), qui dégrade le GLP-1. L'inhibition de la DPP-4 entraîne l'augmentation de GLP-1 et la sécrétion d'insuline (Doucet et al., 2011).

Les biguanides inhibent la production hépatique de glucose en freinant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Wémeau et al., 2014). Cette inhibition entraîne une baisse du rapport ATP/AMP et une activation de l'AMPK (AMP-dépendent Protéine Kinase), une enzyme clé de la régulation du métabolisme énergétique. L'activation de l'AMPK, entraîne une inhibition de la gluconéogenèse et de la lipogenèse et stimule l'oxydation des acides gras (Barau et al., 2016 ; Faure, 2017). **La metformine**, le seul représentant de cette famille, agit également au niveau des muscles en augmentant la captation musculaire du glucose conduisant à une diminution de la glycémie postprandiale (Viollet et al., 2012).

Les inhibiteurs de transporteurs sodium-glucose de type 2 (SGLT-2) sont une nouvelle classe des ADO. Ils inhibent les SGLT-2 dans les tubules proximaux rénaux responsables de la réabsorption du glucose, induisant une réduction de la glycémie sans stimuler la libération d'insuline (Hsia et al., 2018).

Les inhibiteurs des α -glucosidases inhibent spécifiquement l' α -amylase et l' α -glucosidase localisées dans l'épithélium de l'intestin grêle proximal dont la fonction est d'hydrolyser les glucides alimentaires pour leur permettre de passer dans le sang sous forme de monosaccharides. Ils retardent l'absorption intestinale du glucose atténuant ainsi une réduction du pic d'hyperglycémie postprandiale (ADA, 2016).

L'alpha amylase (α -D-glucane glucohydrolases, E.C.3.2.1.1) est une enzyme qui appartient à la famille des endoamylases. Elle est sécrétée sous deux forme ; une salivaire sécrétée par les glandes salivaires et une pancréatique sécrétée par le pancréas (**Kandra, 2003 ; Quezada-Calvillo et al ., 2008**). L' α -amylase salivaire catalyse l'hydrolyse de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène en des oligomères plus courts par le clivage des liaisons glycosidiques α -(1-4). Son action est de courte durée car elle est inactivée par le pH acide de l'estomac. Ensuite, l' α -amylase pancréatique agit sur les produits de la digestion de l' α -amylase salivaire. Elle hydrolyse les liaisons α -(1-4), à l'exception des liaisons α -(1-6) en produisant des oligosaccharides et des disaccharides (**Kandra, 2003**).

Les produits d'hydrolyse de l' α -amylase ne peuvent pas être absorbés par l'intestin, ils sont décomposés par la suite en monosaccharides par les α -glucosidase (α -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.20), une exo-carbohydrolase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons α -glycosidiques α -(1-4) et α -(1-6) à l'extrémité non réductrice terminale de son substrat en monosaccharides. L'inhibition de ces enzymes est l'une des principales thérapies conventionnelles pour contrôler le DT2 (**Alqahtani et al., 2020 ; Riaz et al., 2020**).

L'utilisation prolongée des ADO causent différents effets secondaires qui varient selon la classe et la génération du médicament (**Tableau 3**).

Tableau 3. Les principaux ADO utilisés dans le traitement du diabète de type 2, leurs mécanismes d'action, leurs effets indésirables et leurs contre indications

ADO	Mécanisme d'action	Principaux effets indésirables	Contre-indications	Références
Sulfamides Gliclazide Glibenclamide	insulinosécréteurs	Hypoglycémie Prise de poids Allergies cutanées Risque d'avoir des maladies cardiovasculaires	Insuffisance rénale et hépatique	ADA, 2009.
Biguanides Metformine	insulinosensibilisateurs et réduisent la production de glucose hépatique	Diarrhée Douleurs abdominales Acidose lactique gout métallique Hypoglycémie	Maladie rénale et hépatique, insuffisance respiratoire ou cardiaque	Orban et al., 2006 ; ADA, 2009 ; Pataky et al., 2019
Glinides Natéglinide Répaglinide	insulinosécréteurs et réduisent la production de glucose hépatique	Hypoglycémie	Insuffisance rénale et hépatique	Bosquet et Hartemann-Heurtier, 2004
Inhibiteurs de DPP-4 Sitagliptine Saxagliptine	Inhibent la sécrétion de glucagon et favorise la production d'insuline	Maux de tête Nausées Hypersensibilité rhinopharyngite	Insuffisance rénale et hépatique	Ahrén, 2007 ; Nanjan et al., 2018
Analogues du GLP1 Exénatide Liraglutide	insulinosécréteurs	Nausées Vomissements Pancréatite	Insuffisance rénale	Bosquet et Hartemann-Heurtier, 2004
Inhibiteurs des SGLT Dapagliflozine Canagliflozine Empagliflozine	Réduisent la réabsorption du glucose dans les reins	Infections des voies uro-génitales, hypotension, déshydratation	Insuffisance rénale	Hsia et al., 2018 ; Wanner et al., 2018
inhibiteurs des α-glucosidases Acarbose Miglitol voglibose	Réduisent l'absorption des glucides alimentaires	Douleurs abdominales flatulences Diarrhée	Insuffisance rénale et hépatique Syndrome du colon irritable	Baron, 1998 ; Tremblay et al., 2010

Plusieurs études ont montré également le rôle central des RLs dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer (MA). Les RLs, peuvent activer l'expression de gènes pro-inflammatoires qui maintiennent la réponse inflammatoire et induisent des lésions des tissus cérébraux (**Ramesh et al., 2013**).

La MA est une pathologie évolutive, dégénérative du cerveau qui conduit à la perte progressive et irréversible de neurones, particulièrement dans le cortex et l'hippocampe et perturbe de manière significative la structure et le fonctionnement du cerveau, entraînant une perte de la mémoire (**Korolev, 2014**). Cette maladie est la forme la plus commune de démence affectant surtout les personnes âgées avec une durée moyenne de 3 à 10 ans entre l'apparition des symptômes cliniques et la mort. L'incidence de la MA augmente avec l'âge, surtout après 65 ans (**Liang et Fang, 2006**). Le nombre de personnes atteintes de la MA continuera d'augmenter de manière significative et pourrait atteindre 152 millions d'ici 2050 dans le monde (**ADI, 2019**).

La neuropathologie de la MA est caractérisée par la formation de nombreuses plaques amyloïdes composées de peptide bêta-amyloïde (β A), ou plaques séniles sur les vaisseaux sanguins et sur la surface extérieure des neurones du cerveau, l'agrégation intracellulaire des protéines Tau (Tubulin associated unit) à l'intérieur des neurones, une perte synaptique et un dysfonctionnement des neurotransmetteurs (**Ghiso et Frangione 2002 ; Long et Holtzman, 2019**).

La MA se caractérise par 3 phases évolutives, La phase pré-symptomatique qui se caractérise par l'apparition des premières lésions cérébrales, plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes. Cette longue phase précède la phase pré-démentielle, où les symptômes apparaissent. Enfin intervient la phase de démence très sévère où la perte d'autonomie est totale ; les patients présentent des troubles du comportement (agitation ou apathie, hallucinations, déambulation, troubles du sommeil et de l'appétit, troubles du contrôle des sphincters) et d'autres signes neurologiques (épilepsie, myoclonie, troubles de la marche et de la posture avec chutes, syndromes pyramidal et extrapyramidal).

Le diagnostic de la MA comprend la combinaison de signes cliniques, de tests neuropsychologiques et de techniques d'imagerie cérébrale (imagerie par résonance magnétique (IRM), tomographie à émission de positrons (TEP)). A l'heure actuelle, c'est uniquement l'examen *post mortem* qui peut établir le diagnostic final.

En se basant sur la constatation que l'acétylcholine (ACh) est sévèrement réduit dans le cerveau des patients souffrant de la MA. Le traitement courant de la MA dans la plupart des pays consiste à administrer des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) afin d'augmenter le taux de l'ACh au niveau de la fente synaptique. Ces enzymes sont responsables de la dégradation de l'ACh, neurotransmetteur qui joue un rôle important dans la transmission de l'influx nerveux et qui est cruciale dans les processus de formation de la mémoire (**Liang et Fang, 2006 ; Zengin et al., 2015 ; Bahadori et al., 2016 ; Feng et al., 2017**).

L'acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7) est une enzyme qui appartient à la famille des hydrolases et elle est exprimée au niveau du système nerveux central et des muscles. Tandis que la butyrylcholinestérase (BChE, EC 3.1.1.8) appartient à la classe des carboxylestérases et elle est retrouvée dans le plasma, dans le foie (siège de sa synthèse), dans le pancréas, dans l'intestin, dans les poumons, dans les muscles et dans le cerveau (**Cardon et al., 2005**).

Certains inhibiteurs synthétiques de la cholinestérase sont développés dans l'industrie pharmaceutique (galantamine, tacrine, donépézil) et la plupart d'entre eux ont des effets secondaires tels que l'hépatotoxicité et des troubles gastro-intestinaux (**Wszlaki et al., 2010 ; Khan et al., 2018 ; Riyaphan et al., 2018**).

La consommation d'antioxydants a été considérée comme ayant la capacité de moduler potentiellement le stress oxydatif, ce qui a des impacts bénéfiques sur la prévention et la thérapie des maladies liées au stress oxydatif (**Bonnefont-Rousslot et al., 2001 ; Rajendran et al., 2014**).

Les antioxydants sont des substances qui, à faible concentration sont capables de ralentir ou d'inhiber significativement l'oxydation d'un substrat oxydable (**Halliwell et Gutteridge 1990 ; Fontaine, 2007**). Ils ont pour rôle d'empêcher la formation des RLs, de permettre leur élimination ou bien de réparer les dégâts causés par les RLs (**Berger, 2006 ; Pham-Huy et al., 2008**). L'organisme se protège en permanence contre les effets délétères des RLs grâce à divers mécanismes de défenses antioxydants tant enzymatiques que non enzymatiques et qui sont localisés dans les compartiments intra et extracellulaire (**Pincemail et al., 2002 ; Berger, 2006**). Les systèmes antioxydants enzymatiques existent à l'état endogène et sont considérés comme la première ligne de défense de l'organisme contre le stress oxydant. Il s'agit des superoxydes dismutases (SOD), de la catalase (CAT) et de glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l'anion

superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant à la formation de l'oxygène moléculaire et de l'eau (**Ighodaro et Akinloye, 2018 ; Islam et al., 2019**). Cependant, les systèmes antioxydants non enzymatiques renferment des protéines transporteuses du fer et du cuivre (transferrine, ferritine, céruléoplasmine, albumine), des molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, acide lipoïque, bilirubine, mélatonine, mélanine) et des oligoéléments indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes (Cu, Zn, Mn, Se, Fe). Toutes ces défenses sont renforcées par des apports exogènes en antioxydants apporté par l'alimentation telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), les caroténoïdes, les polyphénols et les flavonoïdes (**Pan et al., 2008 ; Poljsak et al., 2013**).

L'action des antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt en raison de leurs avantages en matière de sécurité, d'efficacité et de propriétés non toxiques ainsi pour leurs usage comme additifs en industrie agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique (**Rajendran et al., 2014 ; Mannino et al., 2020 ; Sfodera et al., 2020**).

Durant ces dernières années, une attention particulière a été accordée aux plantes médicinales en raison de leurs propriétés thérapeutiques nombreuses, qui sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés : **Les métabolites secondaires**. Les métabolites secondaires dépassent actuellement 200 000 substances identifiées (**Vermerris et Nicholson, 2006**). En fonction de leurs structures chimiques, nous distinguons trois classes : les composés phénoliques, les composés azotés, et les composés terpéniques (**Ramawat et Merillon, 2008**). Ces composés sont utilisés comme des agents antidiabétique, anti-inflammatoire, antimicrobien, antiseptique, anti-carcinogène, et antioxydant (**Harborne, 1998 ; Bruneton, 2009**).

Les exemples de quelques métabolites secondaires et de leurs activités biologiques sont consignés dans le tableau suivant

Tableau 4. Propriétés biologiques de quelques métabolites secondaires

Métabolites secondaires	Activités biologiques
Acides Phénoliques	Antibactérienne, Antifongique, Antioxydant (Hannebelle, 2006 ; Bruneton, 2009), antiulcéreuse (Kim et al., 2010).
Coumarines	Anticoagulant, antioxydant, protectrice vasculaire (Bruneton., 2009 ; Hennebelle., 2006), analgésiques (Ito et al., 2005).
Tanins	Favorise la régénération des tissus (Khanbaba et Ree 2001). Piégeurs des radicaux libres (Bruneton., 2009).
Flavonoïdes	Veinoactifs : capable de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et renforce leur résistance. Anti-radicalaires : capable de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxy les moins réactifs : Flavonoïde (OH) + R [·] → flavonoïde (O [·]) + RH (Bruneton., 2009). Chélatrices des ions métalliques (Malesév et Kuntíé, 2007). Anti allergique, hépato protecteur, antivirale, Anti tumorale, antispasmodique diurétique, antioxydant, anti inflammatoire, et antimutagène (Hannebelle, 2006 ; Bruneton, 2009).
Alcaloïdes	Au niveau du système nerveux central, qu'ils soient dépresseurs (morphine) ou stimulantes (caféine), antifibrillants (quinidine), antitumoraux (vincristine), antipaludiques (quinine) (Bruneton, 2009) et antidiabétiques (Azzi, 2013).
Saponines	Antitumoraux : inhibent la formation des tumeurs induite par le virus Epstein-Barr (Bruneton, 2009).

L'Algérie, de part de sa situation géographique, bénéficie d'un climat très diversifié, les plantes poussent en abondance dans les régions côtières, montagneuses et également sahariennes dont beaucoup d'entre elles sont peu ou pas étudiées mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques ; c'est le cas de *Mentha pulegium L.* et de *Santolina chamaecyparissus L.*

M. pulegium est une plante appartenant à la famille des *Lamiacées*, sa saveur est fortement aromatique et son odeur est intense. Elle pousse en abondance dans le nord de l'Europe, dans la région méditerranéenne, en Asie et en Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie). Elle est

largement utilisée en médecine traditionnelle en raison de ses nombreuses vertus thérapeutiques (Marotti et al., 1994 ; Benomari et al., 2018).

Elle est connue par plusieurs noms vernaculaires :

✚ Arabe : Fliou, felgou, afiglou, temarsa ;

✚ Français : Menthe pouliot (Dellile, 2013).

D'un point de vue botanique *M. pulegium* est une petite plante herbacée de 15-40 cm à tiges quadrangulaires, rameuses, grisâtre parfois rougeâtre très feuillées (Dellile, 2013). Ses feuilles sont opposées, ovales, longues de 15 à 25 mm et crénelées sur les bords. Les fleurs sont petites et pédonculées roses ou violacées réunies par des verticilles qui approchent du sommet et forme par leur ensemble des épis droits (Figure 3) (Dellile, 2013 ; Halimi, 2014).

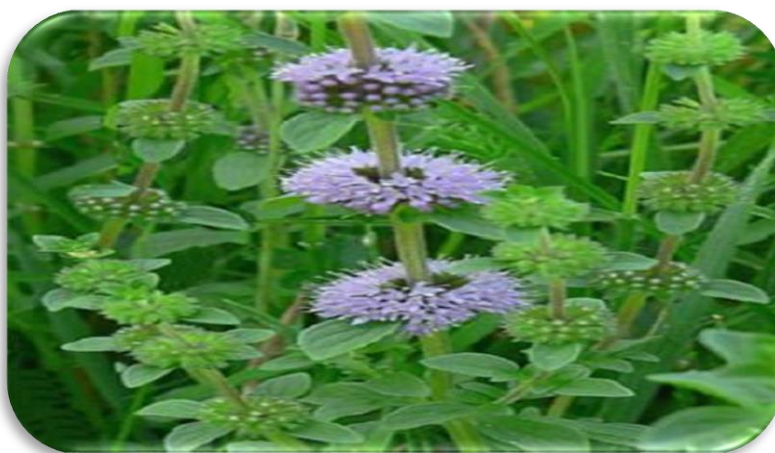


Figure 3: *Mentha pulegium* L. (Halimi, 2014)

D'après Quezel et Santa (1963) ; Guignard et Dupont (2004), la systématique de *M. pulegium* est la suivante :

Règne : végétale

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Mentha*

Espèce: *pulegium*

Nom binomial: *Mentha pulegium*

Cette plante est riche en composés phénoliques et elle contient aussi des alcaloïdes, des stéroïdes et des triterpènes (Zekri et al., 2013). Les métabolites secondaires caractérisés dans *M. pulegium* sont des flavonoïdes, des hydroisocoumarines, des terpènes, des saponines et des stéroïdes (Moghadam et al., 2021).

La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *M. pulegium* a fait l'objet de plusieurs travaux:

Montes et al. (1986), ont montré que l'huile essentielle de *M. pulegium* a la composition chimique suivante : α -pinène, camphène, 3-pinène, limonène, α -phellandène, p-cymène, 1-méthylcyclohexanol, 3-octanol, menthone, menthofurane, méthyl acétate, néomenthol, menthol, isomenthol et la pulégone ;

De plus Teixeira et al. (2012) ont révélé que la pulégone, le menthone et le néo-menthol sont les composants importants de l'huile essentielle de *M. pulegium* européen.

M. pulegium est une plante médicinale largement utilisée pour le traitement de diverses maladies gastro-intestinales telles que la dyspepsie, les vomissements et les nausées (Dorman et al., 2003 ; Delille, 2013 ; Halimi, 2014 ; Khonche et al., 2017). Actuellement, la commercialisation de *M. pulegium* comprend des utilisations comme aromatisants pour les aliments et les boissons, des thés Pennyrile pour soulager le rhume, la toux, les problèmes rénaux et les maux de tête (Caputo et al., 2021).

Des études antérieures ont montré que les extraits de *M. pulegium* possèdent certaines propriétés pharmacologiques, notamment antibactérienne, antifongique (Mozaffari et al., 2012 ; Amalich et al., 2016), analgésique, antispasmodique (Kamkar et al., 2010) antitussive, antivomitif, tonique, insecticide (Sarikurkcu et al., 2012 ; Stagos et al., 2012) anti-inflammatoire (Kogiannou et al., 2013) et antioxydante (Teixeira et al., 2012 ; Gulcin et al., 2020 ; El Aanachi et al., 2021). L'huile essentielle de *M. pulegium* aurait plusieurs propriétés pharmacologiques tels que les effets anthelminthiques et anticancéreux (Kelidari et al., 2021; Sebai et al., 2021).

S. chamaecyparissus est une plante aromatique vivace appartenant à la famille des *Astéracées*, elle est largement répandue dans la région méditerranéenne, le Sud de l'Europe et le Nord de l'Afrique (Maroc, Tunisie et Algérie) (Shing et al., 2002). Elle pousse de manière spontanée sur les coteaux arides ou les zones sauvages rocailleuses (Quézel et Santa, 1963 ; Kisiel et al., 2003 ; Koc et al., 2015). Elle supporte les embruns, le vent, la sécheresse. *S. chamaecyparissus*, est connue sous plusieurs appellations vernaculaires :

- ✚ Arabe (Algerie) : Jaada
- ✚ Français : santoline, petit-cyprès, aurone femelle
- ✚ Anglais : cotton lavender

La santoline est un sous-arbrisseau de 20 à 60 cm de hauteur, possède de nombreuses tiges ligneuses, à rameaux florifères dressés et épaissis au sommet. Les feuilles sont linéaires cylindriques et découpées en lobes fins et disposées sur quatre à six rangs au feuillage vert cendré à gris argenté persistant. Les bractées sont ovales-oblongues, à tiers supérieur villoses. Ses inflorescences se présentent sous forme de capitules qui sont discoïdes de couleur jaune dont le diamètre est de 8 à 10 mm (**Figure 4**) (**Quézel et Santa, 1963 ; Giner et canavate, 2000**).



Figure 4 : *S. chamaecyparissus* (feuilles et sommités fleuries)

La systématique de *S. chamaecyparissus* est la suivante :

Règne : végétale

Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Asteridae Gamopétales

Ordre : Astérales

Famille : Asteraceae

Genre : Santolina

Espèce : *chamaecyparissus*

Nom binomial: *Santolina chamaecyparissus* L. (**Barrero et al., 1999**).

Les plantes de la famille des Astéracées sont une bonne source de protéines, d'huiles essentielles, de vitamines ainsi que les composés phénoliques (**Shing et al., 2002 ; Lemus-Mondaca et al., 2012 ; Koc et al., 2015**). Des études phytochimiques de *S. chamaecyparissus*

ont été investiguées et un nombre de composés acétyléniques, des sesquiterpènes (**Barrero et al., 1999**), des tri-terpènes (**Giner et Canavate, 2000**) d'huiles essentielles (**Sala et al., 2000**), de coumarines (**Ferrari et al., 2005**) et de flavonoïdes (**Giner et Canavate, 2000**) ont été identifiés.

Comme c'est une plante aromatique, *S. chamaecyparissus* contient une variété de composés volatils dans son huile essentielle. Les monoterpènes les plus répandus dans les huiles de *Santolina* sont : artemisia cétone qui présente plus de 60% de la composition chimique de l'huile, artemisia alcool, artemisia triène, santolina triène, santolina alcool, yomogi alcool, chrysanthémyle alcool et lavandulol (**Pala- Paul et al., 1999 ; Cherchi et al., 2001**).

S. chamaecyparissus est très utilisée en médecine populaire grâce à son importante teneur en composés bioactives qui lui donnent des propriétés médicinales non négligeables comme anti-inflammatoire (**Cuellar et al., 1998 ; Sala et al., 2000**) antioxydante (**Nouasri et al., 2015 ; Djeddi et al., 2012**) antibactérien, antifongique (**Salah-Fatnassi et al., 2017**) et anticholinergique (**Giner et al., 1988**). En infusion, les fleurs et les feuilles sont utilisées comme vermifuges pour les enfants et pour traiter les troubles digestifs ainsi que les problèmes menstruels (**Grosso et al., 2009**). Les inflorescences de *S. chamaecyparissus* sont utilisées pour le traitement des céphalées et des catarrhes (**Cavero et al., 2011**).

S. chamaecyparissus est utilisée dans la médecine traditionnelle marocaine pour ses propriétés stomachique, anthelminthique, antidiabétique (**Fdil et al., 2011 ; Lmachraa et al., 2014**). En Tunisie elle est également utilisée traditionnellement pour son effet hypoglycémiant et pour le traitement des douleurs de l'estomac (**Ben Mansour et al., 2011**). Par ailleurs, cette plante s'est révélée être une bonne source de composés inhibiteurs de l'activité de la phospholipase A2 aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (**Sala et al., 2000**).

Matériel

et

méthodes

Cette étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » LAPSAB, département de biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers (SNV-STU), Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen en collaboration avec :

-Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), Constantine ;

-Institut européen des antioxydants (IEA), France.

I. Matériel végétal

1. Préparation des plantes

La plante *Mentha pulegium* a été récoltée dans la Wilaya de Sétif (Algérie) durant le mois d'avril 2018 et La plante *Santolina chamaecyparissus* a été récoltée dans la Wilaya de Djelfa (Algérie) durant le mois de juin 2018.

Les deux plantes ont été identifiées par Professeur MEDJAHDI Boumèdiene (botaniste a la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, département des Recouses Forestières).

Le spécimen de *M. pulegium* (LAPSAB49) et le spécimen *S. chamaecyparissus* (LAPSAB73) ont été déposés dans l'herbier de laboratoire LAPSAB (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie).

Les parties aériennes des deux plantes (fleurs, tiges et feuilles) ont été lavées, laissées séchées à l'abri de la lumière et à une température ambiante et stockées jusqu'à leur utilisation ultérieure pour la préparation des extraits.

2. Préparation des extraits bruts hydrométhanoliques et leurs fractions

La poudre de la partie aérienne de *M. pulegium* (10 g) et de *S. chamaecyparissus* (10 g) a été extraite avec un mélange méthanol/eau (70: 30 v/v) par macération à température ambiante pendant une durée de 72 heures. Le mélange est ensuite filtré et concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à évaporation du méthanol.

Les extraits bruts hydrométhanoliques de *M. pulegium* (EBM) et de *S. chamaecyparissus* (EBS) obtenus sont ensuite fractionnés successivement par extraction liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante (éther diéthylique, acétate d'éthyle et n-butanol). Les solvants sont évaporés à sec par un évaporateur rotatif sous pression réduite.

Les fractions obtenues sont :

Pour l'extrait brut hydrométhanolique de *M. pulegium* (EBM) : fraction d'éther diéthylique (FED-M), fraction d'acétate d'éthyle (FAD-M) et fraction n-butanol (FnB-M).

Pour l'extrait brut hydrométhanolique de *S. chamaecyparissus* (EBS) : fraction d'éther diéthylique (FED-S), fraction d'acétate d'éthyle (FAD-S) et fraction n-butanol (FnB-S).

3. Calculs des rendements

Le rendement (Rdt) d'extraction de l'ensemble des extraits et fractions a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rdt \%} = (M0/M1) \times 100$$

M0 : Masse en gramme du résidu sec obtenu après évaporation.

M1 : Masse en gramme de la matière végétale initiale.

II. Etude phytochimique

1. Screening phytochimique

Les extraits obtenus de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* ont été soumis à divers tests phytochimiques qualitatifs, en vue de mettre en évidence les différentes familles des métabolites secondaires présentes dans la partie aérienne de la plante par des réactions de coloration, de précipitation et des observations sous lumière ultra-violette. Ces tests ont été menés selon les techniques décrites par **Harborne (1998) et Trease et Evans, (2002)**:

➤ **Les composés phénoliques**

Les tanins

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 0,25 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ (1%). Incuber le mélange pendant 15 min à température ambiante. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

Les flavonoïdes

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 1 ml de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose ou rouge ou jaune indique la présence des flavonoïdes.

Les quinones

Dans un tube à essai, introduire 1 mL d'extrait à analyser et ajouter 0,1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH à 1%). L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

Anthraquinones

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 1mL de NH₄OH (10%) puis agiter. L'apparition d'une coloration violette indique la présence des anthraquinones.

Les coumarines : Fluorescence UV

Dans deux tubes à essai, introduire 1ml de l'extrait à analyser, prendre le premier comme témoin et ajouter à l'autre 0,1 mL de NH₄OH (10%). Mettre une goutte de chaque tube sur un papier filtre et examiner sous la lumière UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

➤ **Composés terpéniques**

Les saponines : test de mousse

Dans un tube à essai, introduire 10 ml de l'extrait à analyser, agiter pendant 15 secondes et laisser le mélange au repos pendant 15min. Une hauteur supérieure à 1 cm de mousse persistante indique la présence de saponines.

Terpénoïdes : Test de Slakowski

Dans un tube à essai, introduire 1 ml de l'extrait à analyser, ajouter 0,4 ml de chloroforme et 0,6 mL d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

➤ **Composés azotés**

Les alcaloïdes

Dans deux tubes à essai, introduire 0,5 ml de l'extrait à analyser. Acidifier le milieu par quelques gouttes de HCl (1%) et ajouter 0,5 ml de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5ml de réactif de Wagner dans le second tube. la présence des alcaloïdes est révélée par l'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement.

2. Dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes totaux)

2.1. Dosage des polyphénols totaux:

Les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits bruts hydrométhanoliques et leurs fractions de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* ont été estimées selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par (Vermerius et Nicholson, 2006).

➤ **Principe**

Le réactif Folin-Ciocalteu est un mélange de complexes d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) de couleur jaune. Le principe est basé sur l'oxydation des phénols par ce réactif, ce qui entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en composés phénoliques présents dans les extraits étudiés.

➤ **Mode opératoire**

0,1 ml de l'extrait ou fraction (1 mg/ml) sont mélangés avec 2 ml de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (2%). Après 5 min d'incubation, 0,1 mL du réactif du Folin-Ciocalteu (1N) est ajouté au mélange. Le mélange final est incubé pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. La lecture des absorbances a été effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 725 nm.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme étalon.

➤ **Expression des résultats**

Les teneurs en polyphénols totaux sont calculées à partir de l'équation de régression linéaire ($y = 0,0026x$) de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec (μg EAG/mg E).

2.2. Dosage des flavonoïdes totaux:

Les teneurs en flavonoïdes des différents extraits bruts hydrométhanoliques et leurs fractions préparés à partir de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissu* ont été déterminées selon la méthode décrite par Zhishen et al., (1999).

➤ **Principe**

Dans le milieu réactionnel, l'hydroxyde de sodium (NaOH) ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. La présence du chlorure d'aluminium dans la solution mène à la formation d'un complexe entre les ortho-hydroxyles du flavonoïde et les fonctions carbonyles des noyaux aromatiques. Ce complexe absorbe à 510 nm (**Martono et al., 2019**).

➤ **Mode opératoire**

250 µl de l'extrait ou fractions (1mg/ml) sont mélangés avec 1ml d'eau distillée et 75 µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO₂) à 15%. Après 6 min d'incubation à température ambiante, 75 µl de chlorure d'aluminium AlCl₃ à 10% sont ajoutés. Après 6 min de repos à température ambiante 1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) (4%) est apporté au mélange. Le volume total est complété à 2,5 ml d'eau distillée. La solution finale est bien mélangée et gardée à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 510 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant la catéchine comme étalon.

➤ **Expression des résultats**

Les teneurs en flavonoïdes totaux sont calculées à partir de l'équation de régression linéaire ($y = 0,003x$) de la courbe d'étalonnage de la catéchine.

Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent de catéchine par milligramme d'extrait sec (µg EC/mg E).

3. Identification des composés phénoliques par RP- HPLC-DAD

L'analyse a été réalisée par Dr EL HACI Imad Abdelhamid, maître de recherche classe A au centre de recherche scientifique et technique en analyse physico-chimique C.R.A.P.C, au Laboratoire de Produits Naturels, Département de Biologie, Faculté SNV-STU, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen.

L'identification des composés phénoliques des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des deux plantes est réalisée par chromatographie en phase liquide à haute performance sur un système Perkin Elmer Flexar équipé d'une pompe de distribution de solvant binaire reliée à un détecteur à barrette de diodes (RP-HPLC-DAD). La séparation a été effectuée sur une colonne Eclipse ODS Hypersil C18 (150 mm × 4,6 µm) utilisée en tant que phase stationnaire à température ambiante avec un débit maintenu à 1 ml/min. La phase mobile utilisée a été

composée d'acide acétique (A) et l'acétonitrile (B). Les composés phénoliques sont éluées en utilisant le gradient d'éluion suivant : 5 min avec 10% de B, 25 min avec 90% de B, 15 min de gradient linéaire de 90% à 100% de B, puis 20 min avec 100% de B. Le volume d'injection est de l'ordre de 20µl et les chromatogrammes sont détectés et enregistrés à 280 nm (El Hacı et al., 2020). Les composés phénoliques ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention et leurs spectres UV avec ceux d'étalons purs.

III. Etude biologique

1. Evaluation de la cytotoxicité des extraits vis-à-vis des globules rouges (Test d'hémolyse)

➤ Principe

Le test de l'effet hémolytique de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* préparé par macération et de leurs fractions riches en composés phénoliques a été réalisé, *in vitro*. Le principe de ce test consiste à mettre en contact une suspension érythrocytaire humaine incubée à 37 °C durant 60 min avec différentes concentrations d'extraits, tout en mesurant la fuite d'hémoglobine qui se traduit par un éclatement des cellules érythrocytaires.

➤ Mode opératoire

Le test d'effet hémolytique des extraits des deux plantes étudiées a été réalisé selon la méthode de **Guo-Xiang et Zai-Qun (2008), OMS (2011) :**

Du sang fraîchement prélevé d'un donneur sain sur tube hépariné a été effectué puis centrifugé à 3000 tours/min à 4 °C durant 5 minutes. Après élimination du plasma, le culot est lavé 2 fois puis dilué avec une solution tampon phosphate saline (PBS) (10 mM ; pH 7,4).

Un volume de 2970 µL de la suspension érythrocytaire (diluée 20 fois) a été incubé avec 30 µL d'extrait à différentes concentrations (25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml et 200 mg/ml) pendant 60 minutes dans un incubateur agitateur (Orbital Shaker Thermo Forma) à 37°C.

Des prélèvements de 500 µL ont été réalisés pour être resuspendus dans 1500 µL d'une solution de lavage PBS. Les tubes ont été centrifugés 3000 tours/minutes à 4 °C pendant 5 minutes et la fuite de l'hémoglobine intracellulaire a été mesurée par la lecture de l'absorbance du surnageant à une longueur d'onde de 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis, contre un blanc contenant du PBS.

Un témoin négatif est préparé dans les mêmes démarches expérimentales. Il est composé de 2970 µl de suspension érythrocytaire non diluée et 30 µl du PBS, en absence d'extrait.

Dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons préparé un tube d'hémolyse totale qui contient 250 µl de la suspension érythrocytaire et 4750 µl d'eau distillée, en absence d'extrait.

➤ **Expression des résultats**

Pour chaque extrait, les taux d'hémolyse en pourcentage ont été déterminés selon l'équation suivante :

$$\text{taux d'hémolyse (\%)} = \frac{A(\text{extrait 60min}) - A(\text{témoin négatif 60min})}{A(\text{hémolyse totale 60min}) - A(\text{témoin négatif 60 min})} \times 100$$

2. Evaluation de l'activité antioxydante

2.1. Piégeage du radical DPPH[•]

➤ **Principe**

Au contact d'une substance donneuse de proton le DPPH[•] de couleur violette est réduit en DPPH-H de couleur jaune. Ce virage de la couleur met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm.

➤ **Mode opératoire**

L'activité de piégeage du radical DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) a été réalisée selon la méthode rapportée par **Boussadia et al. (2020)**.

Dans une microplaque de 96 puits, 160 µl de solution méthanolique de DPPH ont été mélangés avec 40 µl de chaque extrait à différentes concentrations. L'absorbance a été mesurée à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits (Enspire Perkin Elmer). Le BHT (le butylhydroxytoluène), le BHA (butylhydroxyanisole) et l'acide ascorbique ont été utilisés comme antioxydants de référence.

➤ **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition I (%) a été calculé à l'aide de la formule suivante:

$$I (\%) = ((A \text{ contrôle} - A \text{ extrait}) \times A \text{ contrôle}) \times 100 \dots\dots\dots(1).$$

Les CI_{50} ont été déterminées graphiquement à partir des courbes de régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de chaque extrait.

2.2. Piégeage du radical ABTS^{•+}

➤ Principe

Le radical ABTS^{•+} est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium (**Re et al., 1999**). Cette formation se traduit par l'apparition d'une coloration verte bleu intense. En présence d'un donneur d'hydrogène, le passage du radical ABTS^{•+} à la forme radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée à 734 nm.

➤ Mode opératoire

L'activité de piégeage du radical cationique ABTS^{•+} (2,2'-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) a été évaluée selon la méthode de **Re et al. (1999)**.

ABTS^{•+} a été préparé en mélangeant 5 ml de solution d'ABTS (7 mM) et 5 ml de persulfate de potassium (2,45 mM). Le mélange a été stocké à l'obscurité et à température ambiante pendant 12-16 h.

Avant l'utilisation du radical ABTS^{•+}, la solution a été diluée par l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance de $0,700 \pm 0,02$ à 734 nm. Ensuite 40 μ l des extraits à différentes concentrations ont été mélangés à 160 μ l de solution ABTS. Après 10 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Enspire Perkin Elmer). Le BHT, le BHA et le Trolox ont été utilisés comme standards.

➤ Expression des résultats

La formule (1) ci-dessus a été utilisée pour calculer le pourcentage d'inhibition et les résultats ont été exprimés en CI_{50} (concentration d'inhibition de 50%) (μ g/ml).

Les CI_{50} ont été déterminées graphiquement à partir des courbes de régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibition du radical ABTS en fonction des différentes concentrations de chaque extrait.

2.3. Piégeage du radical galvinoxyl (GOR)

➤ Principe

Le radical galvinoxyl (Gox*) est un radical stable de couleur jaune foncé qui est réduit en composé décoloré (GoxH) lorsqu'il réagit avec les donneurs d'hydrogène. Cette réduction se traduit par une diminution de l'absorbance à 428 nm (**Shi et al., 2001**).

➤ Mode opératoire

L'activité de piégeage des extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissu* vis à vis du radical galvinoxyl (GOR) a été évaluée selon la méthode décrite par **Shi et al., (2001)**. 160 µl de solution méthanolique de Galvinoxyle (0,1 mM) ont été ajoutés à 40 µl de chaque extrait à des concentrations différentes. Après 120 min d'incubation, l'absorbance est lue à 428 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Enspire Perkin Elmer). Le BHT et le BHA ont été utilisés comme antioxydants de référence.

➤ Expression des résultats

La formule (1) ci-dessus a été utilisée pour calculer le pourcentage d'inhibition. Les résultats ont été exprimés en valeurs CI₅₀ (µg/ml).

La concentration d'extrait donnant une inhibition de 50% (CI₅₀) a été déterminée graphiquement à partir d'une courbe de régression logarithmique des pourcentages d'inhibition du radical galvinoxyl en fonction de différentes concentrations de chaque extrait.

2.4. Piégeage de l'anion superoxyde

➤ Principe

La capacité des extraits de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* a piégé le radical superoxyde généré dans un système non enzymatique, est étudiée en suivant la réduction du nitro-blue- tetrazolium (NBT) en formazan qui absorbe à 560 nm (**Parejo et al., 2002**).

➤ Mode opératoire

La capacité de piégeage du radical superoxyde des extraits a été déterminée en utilisant la méthode définie par **Kunchandy et Rao (1990)**.

Dans une microplaque de 96 puits, le mélange réactionnel contient 40 µl d'extrait, 130 µl de DMSO alcalin (20 mg de NaOH dans 100 ml de DMSO), et 30 µl de NBT (1 mg/ml). Après 5 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 560 nm à l'aide d'un lecteur de

microplaques (Enspire Perkin Elmer). Le BHT et le BHA ont été utilisés comme antioxydants de synthèse (témoin positif).

➤ **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition I (%) a été calculé à l'aide de la formule (1) ci-dessus et les résultats ont été exprimés en CI_{50} (concentration d'inhibition de 50%) ($\mu\text{g/ml}$).

Les CI_{50} ont été déterminées graphiquement à partir des équations courbes des régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibition de l'anion superoxyde en fonction de différentes concentrations de chaque extrait.

2.5. Test PAOT-Liquide ®

La technologie PAOT (Pouvoir Antioxydant Total) Liquide ® est l'unique méthode permettant de mesurer rapidement, à la fois l'activité antioxydante et l'activité oxydante globale. C'est une méthode qui permet la détermination de la capacité antioxydante totale des diverses matrices, telles que les produits alimentaires, préparations cosmétiques et médicinales, fluides biologiques ou extraits de plantes.

➤ **Principe**

Le principe de cette méthode est basée sur la mesure de la variation de potentiel électrique résultant de réactions chimiques entre les composés phénoliques des différents extraits et le médiateur des radicaux libres (M^*) comme source d'oxydants.

➤ **Mode opératoire**

Grâce au dispositif robuste, la mesure a été effectuée en milieu réactionnel à température 24–27°C contenant 1 ml de solution physiologique et une molécule à l'état radicalaire appelée médiateur (M^*). Deux microélectrodes, une étant l'électrode de travail et la seconde l'électrode de référence, ont ensuite été immergées. Après ajout de 20 μl d'antioxydants purs (1 mM de finale) ou extrait, l'activité PAOT-liquide ® a été estimée en enregistrant des modifications du potentiel électrochimique dans le milieu réactionnel (en raison de changements dans la concentration des formes oxydées / réduites du médiateur M^* pendant la réaction avec des antioxydants comme AOX (médiateur oxydé $M^* + \text{AOX} \rightarrow$ médiateur réduit $M + \text{AOX}$ oxydé).

➤ **Expression des résultats**

Les résultats ont été calculés selon la formule suivante :

$$\text{Activité antioxydante} = ((EP\ 10 - EP\ 0) / EP\ 0) \times 100\%$$

- ✚ EP 0: le potentiel électrochimique au temps 0
- ✚ EP10: le potentiel électrochimique obtenu après 10 min d'enregistrement en présence des différents extraits.

Le pouvoir antioxydant totale des extraits bruts hydrométhanoliques de la partie aérienne de *M.pulegium* et *S.chamaecyparissus* et de leurs fractions riches en composés phénoliques a été estimé selon l'échelle PAOT-Score Scale ®,Ingredients (Figure 05).

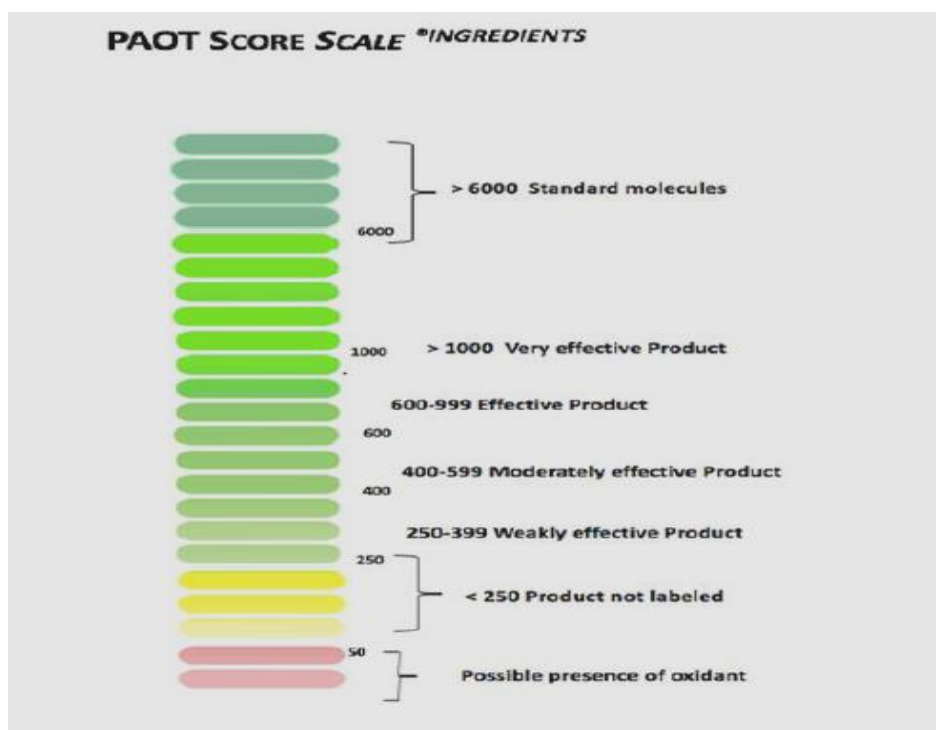


Figure 5: L'échelle PAOT-Score Scale ®, Ingredients

2.6. La capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

➤ **Principe**

La méthode CUPRAC est basée sur la mesure de l'absorbance du complexe Cu(I) Néocuproïne (Nc) de couleur jaune orangé formé suite à une réaction d'oxydoréduction des agents antioxydants en clivent la chaîne Cu(II)-Nc (Özyürek et al., 2011).

➤ **Mode opératoire**

La réduction des ions cuivriques a été évaluée selon la méthode décrite par **Apak et al. (2004)**.

Dans une microplaque à 96 puits, 50 µl de CuCl₂ (10 mM), 50 µl de néocuproïne (7,5 mM) et 60 µl de tampon acétate d'ammonium (1 M, pH 7,0) ont été ajoutés à 40 µl d'échantillon à différentes concentrations. Après 1h, l'absorbance du mélange a été mesurée à 450 nm.

Le BHT et le BHA ont été utilisés comme antioxydants de synthèse (témoin positif).

➤ **Expression des résultats**

Les résultats ont été exprimés en valeurs A_{0,5} (concentration de l'échantillon donnant une absorbance de 0,5). Les valeurs A_{0,5} ont été déterminées à partir des courbes de régressions linéaires d'absorbance en fonction des différentes concentrations de chaque extrait.

2.7. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

➤ **Principe**

Le pouvoir réducteur du fer des différents extraits a été évalué par la réaction d'oxydo-réduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer. Le ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ fournit des ions de fer Ferriques (Fe³⁺) qui seront réduits en fer Ferreux (Fe²⁺) par les antioxydants présents dans l'extrait. Cette réduction est suivie par la mesure de l'absorbance à 700 nm.

➤ **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu, (1986)**. Dans une microplaque à 96 puits, on mélange 10 µl de chaque extrait avec 40 µl de tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 50 µl de ferricyanure de potassium (1%). Le mélange a été incubé à 50°C pendant 20 min. Après refroidissement, 50 µl d'acide trichloracétique (10%), 40 µl d'eau distillée et 10 µl de chlorure ferrique (0,1%) ont été ajoutés. L'absorbance est mesurée à 700 nm en utilisant un lecteur de microplaques de 96 puits. L'acide ascorbique, l'acide tannique et l'α-tocophérol ont été utilisés comme antioxydants de synthèse.

➤ **Expression des résultats**

Les résultats ont été exprimés en A_{0,5}. Les valeurs A_{0,5} ont été déterminées à partir des courbes des régression linéaires d'absorbance en fonction de différentes concentrations de chaque extrait.

2.8. Pouvoir réducteur du fer (méthode de Phénanthroline)

➤ Principe

Cette méthode est basée sur la capacité d'un agent antioxydant à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} qui va ensuite réagir avec 1,10-phénanthroline pour former le complexe rouge-orangé qui absorbe à 510 nm (Szydłowska-Czerniaka et al., 2008).

➤ Mode opératoire

L'activité de la phénanthroline a été évaluée en utilisant le protocole décrit par Szydłowska-Czerniaka et al., (2008).

Le mélange réactionnel est constitué de 10 μ l d'échantillon, 50 μ l de solution de $FeCl_3$ (0,2%), 30 μ l de solution de 1,10-phénanthroline (0,5%) et 110 μ l de méthanol. Le mélange a été incubé pendant 20 min à 30 °C. L'absorbance a été mesurée à 510 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits (Enspire Perkin Elmer). BHT et BHA ont été utilisés comme standards.

➤ Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés sous forme d' $A_{0,5}$ (concentration de l'échantillon donnant une absorbance de 0,5). Les valeurs $A_{0,5}$ ont été déterminées à partir des équations de courbes des régressions linaires d'absorbances en fonction des différentes concentrations de chaque extrait.

2.9. Blanchissement du β -carotène

➤ Principe

Le test de blanchiment du β -carotène est basé sur la décoloration du β -carotène en raison de sa réaction avec les radicaux peroxydes générés par l'oxydation de l'acide linoléique. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (Kartal et al., 2007).

➤ Mode opératoire

Le test de blanchiment du β -carotène a été réalisé suivant le protocole décrit par Boussadia et al. (2020).

L'émulsion β -carotène/acide linoléique a été préparée de la manière suivante : 0,5 mg de β -carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme. En suite, 40 mg d'acide linoléique et 400 mg du Tween 40 ont été ajoutés au mélange. Après évaporation complète du chloroforme au

rotavapeur, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée. 0,2 ml de chaque échantillon a été mélangé à 3 ml de l'émulsion et incubé pendant 120 min à 50°C. L'absorbance est mesurée à 470 nm. Le BHT et le BHA ont été utilisés comme des standards.

➤ **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition I (%) a été calculé à l'aide de la formule suivante:

$$I (\%) = [1 - (A_{\text{extrait T0}} - A_{\text{extrait T120}}) / (A_{\text{control T0}} - A_{\text{control T120}})] \times 100$$

A : absorbance

T₁₂₀ : absorbance à T = 120 min

T₀ : absorbance à T = 0 min

3. Evaluation de l'activité anti-hémolytique

➤ **Principe**

L'attaque radicalaire a été induite par l'addition du AAPH (2,2'-azobis (2-aminodipropane) dihydrochloride) à la suspension érythrocytaire préalablement incubée avec les extraits des deux plantes. Après quatre heures d'incubation avec l'AAPH à 37 °C, la cinétique de disparition progressive des hématies a été suivie par la mesure de la diminution de l'absorbance à 630 nm. L'AAPH est un composé azoïque dont la structure est C₈H₂₀Cl₂N₆, générant des radicaux libres. Il a une grande importance en tant qu'un modèle oxydant des micro ou macromolécules, il est utilisé dans le domaine thérapeutique pour sa capacité à initier des réactions d'oxydation via des mécanismes à la fois nucléophiles et radicaux libres (Werber et al., 2011).

➤ **Mode opératoire**

La résistance des érythrocytes prétraités par les extraits des deux plantes à l'attaque radicalaire a été évaluée selon le protocole décrit par Niki et al. (1998) et Takebayashi et al. (2010)

Le sang a été obtenu à partir d'un donneur sain et recueilli sur un tube hépariné, puis centrifugé à 3000 tours/ min, pendant 10 min à 4° C. Le culot est lavé 2 fois avec une solution tampon phosphate salin (pH 7,4; PBS).

Dans une microplaque de 96 puits, 200µl du radical AAPH (50 mM dissout dans du PBS) ont été ajoutés à la suspension érythrocytaire préalablement incubée (10 min à 37°C) avec 20µl

d'extraits des deux plantes. Pour chaque extrait quatre concentrations ont été testées (10 µg/ml, 20µg/ml, 40 µg/ml, 80µg/ml). L'acide ascorbique a été utilisé comme standard.

➤ **Expression des résultats**

La résistance des globules rouges à l'attaque radicalaire a été exprimée en absence et en présence des extraits par le temps nécessaire à la lyse de 50 % des érythrocytes (*half-hemolysis time* ; HT₅₀).

4. Evaluation de l'activité antidiabétique

4.1. Recherche de l'activité inhibitrice de l' α -amylase

Pour cette activité nous avons utilisé l' α -amylase pancréatique d'origine porcine (E.C.3.2.1.1). Cette enzyme a une structure proche de l' α -amylase humaine. Elle se présente sous forme lyophilisée (13000 Da et une activité spécifique de 13UI/ml). L'optimum de l'activité catalytique est mesuré à pH 6,9 pour une température de 37°C.

La solution d'enzyme utilisée dans cette technique a été préparée à 3,9 UI/ml (qui correspond à 1,3 UI/ml dans le milieu réactionnel) par dissolution de 3 mg d'enzyme lyophilisée dans 10 ml de tampon phosphate (0,02 M, 6,7 mM NaCl, pH 6,9)

Le substrat utilisé est l'amidon soluble de pomme de terre : 1g d'amidon soluble a été dissout dans 100 ml de solution tampon phosphate (0,02 M, 6,7 mM NaCl, pH 6,9) sous agitation (50-70°C).

Pour la préparation de la solution chromogène 3,5-dinitrosalicylique (DNSA), 30 g de tartrate double de sodium et de potassium est solubilisé dans 20 ml de NaOH (2N) préalablement chauffée à 60°C sous agitation. 1g du DNSA a été dissout dans 40 ml d'eau distillée préchauffée. Les deux solutions obtenues sont mélangées sous agitation pour obtenir un réactif limpide de couleur jaune-orange. Le volume final est ajusté à 100 mL avec de l'eau distillée. Le réactif obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à 4°C.

➤ **Principe**

Cette méthode consiste à évaluer l'effet inhibiteur des extraits bruts des deux plantes étudiées et leurs fractions sur l'activité de l' α -amylase pancréatique. En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation des groupements aldéhydes libres des sucres provoque simultanément la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) de couleur jaune orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique de couleur rouge orange qui absorbe à 540 nm. L'intensité de la coloration

est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel (Thalapaneni et al., 2008).

➤ **Mode opératoire**

L'effet inhibiteur de l' α -amylase de l'extrait d'hydrométhanolique et de ses fractions a été déterminé par la méthode décrite par **Thalapaneni et al. (2008)**.

Un mélange de 200 μ l d'échantillon et 200 μ l de tampon phosphate de sodium 20 mM (pH 6,9 avec chlorure de sodium 6,7 mM) contenant une solution d' α -amylase a été incubé à 37°C pendant 10 min. Après incubation, 200 μ l de solution d'amidon soluble (1%) ont été ajoutés. Après une incubation de 15 min à 37°C, 400 μ l d'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) ont été ajoutés. Le mélange a été placé, ensuite dans un bain-marie à 100 °C pendant 5 min. L'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible

Une solution d'Acarbose (Glucobay ® 50), utilisée comme standard à différentes concentrations, est préparée dans la solution tampon phosphate (pH 6,9 , 0,02 M).

➤ **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition I (%) a été calculé à l'aide de la formule :

$$I (\%) = ((A \text{ contrôle} - A \text{ extrait}) \times A \text{ contrôle}) \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

L'activité inhibitrice de l'alpha-amylase a été exprimée en valeurs de CI₅₀. Elle est déterminée en μ g/ml à partir des courbes de régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits, fraction ou standard.

4.2. Recherche de l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase

L'origine de l' α -glucosidase utilisée dans cette étude est une levure *Saccharomyces cerevisiae* (E.C.3.2.1.20). Elle se présente sous forme lyophilisée. Le substrat utilisé est le *p*-Nitrophenyl α -D-Glucoside (*p*-NPG).

➤ **Principe**

L' α -glucosidase catalyse la réaction de la dégradation du *p*-NPG en D-glucopyranoside et en *p*-nitrophénol (*p*-NP). Le *p*-nitrophénol (*p*-NP) qui absorbe à 400 nm permet l'évaluation de l'activité enzymatique de l' α -glucosidase. Le principe consiste à mettre en contact les différents extraits et fractions de *M.pulegium* et *S.chamaecyparissus* avec l' α -glucosidase et son substrat *p*-NPG. L'effet inhibiteur des différents extraits et fractions a été déterminé par la mesure de la quantité du *p*-NP libéré dans le milieu réactionnel (**Mosihuzzman et al., 2013**).

➤ **Mode opératoire**

L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase d'extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* a été réalisée selon la méthode de **Lordan et al. (2013)**.

Dans une microplaque à 96 puits, 50 μ l de l'extrait à différentes concentrations et 50 μ l de pNPG (5 mM) ont été mélangés et pré-incubés pendant 5 min à 37°C. Puis, 100 μ l de tampon phosphate (100 mM, pH 6,9) contenant l'enzyme ont été ajoutés. Après 30 min d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par l'addition du carbonate de sodium (100 mM). L'absorbance a été mesurée à 400 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

Une solution d'Acarbose (Glucobay ® 50), a été utilisée comme standard à différentes concentration.

➤ **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition a été calculé à l'aide de la formule (2) ci-dessus. L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase a été exprimée en termes de valeurs de la CI₅₀ (concentration de l'échantillon inhibant 50% de l'activité de l'alpha-glucosidase). Elle est déterminée en μ g/ml à partir des courbes de régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits, fractions ou standards.

4.3. Activité antiglycation (recherche d'effet antiglycant)

➤ **Principe**

Dans cette étude, la BSA (Bovine Serum Albumin) a été choisie comme modèle pour la formation de la glycation protéique. L'incubation *in vitro* de BSA avec une forte concentration de glucose conduit à une glycosylation non enzymatique caractérisée par la production des AGE (Advanced Glycation End products). l'effet antiglycant a été déterminé par la mesure de la fluorescence caractéristique des AGE produit dans le milieu d'incubation (**Yeh et al., 2017**).

➤ **Mode opératoire**

Le potentiel d'antiglycation des extraits des deux plantes étudiées a été évalué *in vitro* selon la méthode de (**Matsuura et al., 2002**):

500 μ L de mélange réactionnel ont été préparé contenant 100 μ l de BSA (4mg/ml), 100 μ l de glucose (200 mM), 10 μ l d'extrait à différentes concentrations, 250 μ l de tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,4) et 40 μ l d'eau distillée. Après 48h d'incubation à 60°C, le mélange est laissé refroidir.

100 µl de chaque tube ont été transférés dans des tubes puis 10 µl de TCA ont été ajoutés suivi par agitation et centrifugation (15000 rpm, 4 min, 4°C). Après élimination du surnageant, 400 µl de PBS (pH 10) ont été ajoutés au précipité (AGE-BSA) pour la dissolution.

200 µl ont été transféré de chaque tube dans une microplaque noire à 96 puits et la fluorescence est mesurée à 370 nm (excitation) et 440 nm (émission) respectivement en utilisant un lecteur de microplaques (Enspire Perkin Elmer).

➤ **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition de la formation des AGE selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition AGE} = (1 - \text{fluorescence échantillon} / \text{fluorescence contrôle}) \times 100$$

L'activité antiglycation est exprimée en valeurs de CI₅₀. Elle est déterminée en µg/ml à partir des courbes de régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits, fraction ou standard.

5. Evaluation de l'activité anti-Alzheimer

5.1. Recherche d'activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE)

AChE (EC 3.1.1.7) de l'anguille électrique et BChE (EC 3.1.1.8) de sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et chlorure de butyrylthiocholine ont été utilisés comme substrats de l'AChE et BChE, respectivement avec l'acide 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoïque (DTNB) pour la mesure de l'activité anticholinestérase.

➤ **Principe**

Le test de l'AChE, est réalisé selon le principe de l'hydrolyse de l'iodure d'acétylthiocholine en acétate et en thiocholine, qui à son tour réagit avec le 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) pour donner le jaune 5-thio-2-nitrobenzoate qui absorbe à 412 nm. Pour le test de la BChE, le chlorure de butyrylthiocholine est hydrolysé en acide butyrique et en thiocholine, qui à son tour réagit avec le 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) pour donner le jaune 5-thio-2-nitrobenzoate qui absorbe à 412 nm (**Ellman et al., 1961**).

➤ **Mode opératoire**

Les activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) ont été évaluées à l'aide de la méthode décrite par **Ellman et al. (1961)** et **Öztürk et al. (2011)**. Après 15 min d'incubation à 37°C du mélange réactionnel composé de différentes

concentrations d'extrait ou de galantamine (10 µl), 150 µl de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 8,0) et 20 µl d'AChE (5,32 x 10⁻³ U/ml) ou de BChE (6,85 x 10⁻³ U/ml), 10 µl de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés au mélange. De plus, la réaction a ensuite été amorcée par addition de 10 µl de l'acétylthiocholine (0,71 mM) ou de butyryl thiocholine (0,2 mM). La galantamine a été utilisée comme inhibiteur standard.

L'absorbance a été lue à 412 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaque.

➤ **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition a été déterminé selon la formule (2) ci-dessus. L'activité inhibitrice de la cholinestérase a été exprimée en valeurs de CI₅₀. Elle est déterminée à partir des courbes de régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits, fraction ou standard.

6. Analyses statistiques

Tous les tests ont été réalisés en triplicate. Les résultats sont exprimés en moyenne ± MES (Moyenne Erreur Standard). L'analyse statistique a été réalisée par analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA) suivie du test post hoc de Tukey et Student-Newman-Keul pour des comparaisons multiples. Elle a été réalisée à l'aide du logiciel IBM SPSS statistics V26 d'IBM. Des courbes de corrélation ont été tracées entre les teneurs en polyphénols totaux et l'activité antioxydante, antidiabétique, antiglycation et anti-Alzheimer des extraits et fractions de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* en utilisant EXCEL.

Résultats

et

interprétation

I. Caractéristiques des extraits préparés

L'extraction eau-méthanol (30/70) par macération des parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) de *Mentha pulegium* et *Santolina chamaecyparissus*, séchées et broyées, suivie d'un fractionnement liquide-liquide des extraits bruts obtenus (EBM et EBS) par trois solvants à polarité différente: éther diéthylique (FED-M et FED-S), acétate d'éthyle (FAE-M et FAE-S) et n-butanol (FnB-M et FnB-S), nous a permis de récupérer des extraits et des fractions de différentes couleurs, aspects et rendements.

Le **tableau 5** résume respectivement les caractéristiques des extraits bruts hydrométhanoliques de la partie aérienne et de leurs fractions, à savoir l'aspect physique, la couleur et le rendement d'extraction.

Tableau 5. Caractéristiques des extraits bruts hydrométhanoliques de la partie aérienne de *Mentha pulegium* et *Santolina chamaecyparissus* et de leurs fractions obtenues.

Plante	Extrait/fraction	Aspect	Couleur	Rendement %
<i>M. pulegium</i>	EBM	Cristallisé	Marron foncée	19
	FAE-M	poudre	Marron claire	7,1
	FnB-M	Cristallisé	Marron claire	5,12
	FED-M	Pâteux	Verte foncée	3,04
<i>S. chamaecyparissus</i>	EBS	pâteux	Marron foncée	10,3
	FAE-S	pâteux	Marron foncée	6,2
	FnB-S	pâteux	Marron foncée	4,4
	FED-S	pâteux	Marron foncée	3,2

M. pulegium : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique. *S. chamaecyparissus* : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique.

Nous avons remarqué que l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions obtenues à partir de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* ont été récupérées sous forme de pâte et de cristaux de la même couleur (marron), à l'exception de la fraction FED-M de *M. pulegium* qui a présenté une couleur verte foncée et la fraction FAE-M de *M. pulegium* qui a été récupéré sous forme de poudre.

De plus, les résultats ont montré que les rendements d'extraction calculés varient entre 3,04 et 19 % pour *M. pulegium* et entre 3,2 et 10,3 % pour *S. chamaecyparissus*. Cependant, les

rendements les plus faibles ont été obtenus après fractionnement par l'éther diéthylique des deux plantes : FED-M (3,04 %) et FED-S (3,2 %).

II. Etude phytochimique

1. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles chimiques existantes dans la partie aérienne des différents extraits bruts hydrométhanoliques de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* et leurs fractions par des réactions qualitatives de caractérisation. Les résultats du screening phytochimique sont représentés dans **les tableaux 6 et 7**.

Tableau 6. Screening phytochimique de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *M. pulegium* et ses fractions obtenues

	EBM	FAE-M	FnB-M	FED-M
Alcaloïdes	+	+	+	+
Tanins	+	+	+	+
Flavonoïdes	+	+	+	+
Quinones libres	+	+	+	+
Coumarines	+	+	+	+
Anthraquinones	-	-	-	-
Terpénoïdes	+	+	+	+
Saponines	+	-	-	+

(+) présence, (-) absence, *M. pulegium* : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique

Tableau 7. Screening phytochimique de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* et ses fractions obtenues.

	EBS	FAE-S	Fn-B-S	FED-S
Alcaloïdes	+	+	+	+
Tanins	+	+	+	+
Flavonoïdes	+	+	+	+
Quinones libres	+	+	+	+
Coumarines	+	+	+	+
Anthraquinones	-	-	-	-
Terpénoides	+	+	+	+
Saponines	+	-	+	-

(+) présence, (-) absence. *S. chamaecyparissus* : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique.

Les résultats du screening phytochimique ont montré la richesse des deux plantes en métabolites secondaires.

Le screening phytochimique réalisé sur les différents extraits préparés de la partie aérienne de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* a révélé la présence des flavonoïdes, tanins, coumarines, quinones libres, alcaloïdes et terpénoïdes dans l'ensemble des extraits bruts hydrométhanoliques (EBM et EBS) et leurs fractions récupérées. Les saponines ne sont présents que dans l'extrait brut hydrométhanolique et la fraction éther diéthylique de *M. pulegium* et dans l'extrait brut hydrométhanolique et la fraction n-butanol de *S. chamaecyparissus*.

Par ailleurs, nous avons noté l'absence d'anthraquinones dans la totalité des extraits préparés (**Tableau 6 et 7**).

2. Dosage des composés phénoliques

L'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions obtenues de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* ont été analysés quantitativement par spectrophotométrie. Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux ont été obtenues en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (**Figure 6**) et de la catéchine (**Figure 7**), respectivement.

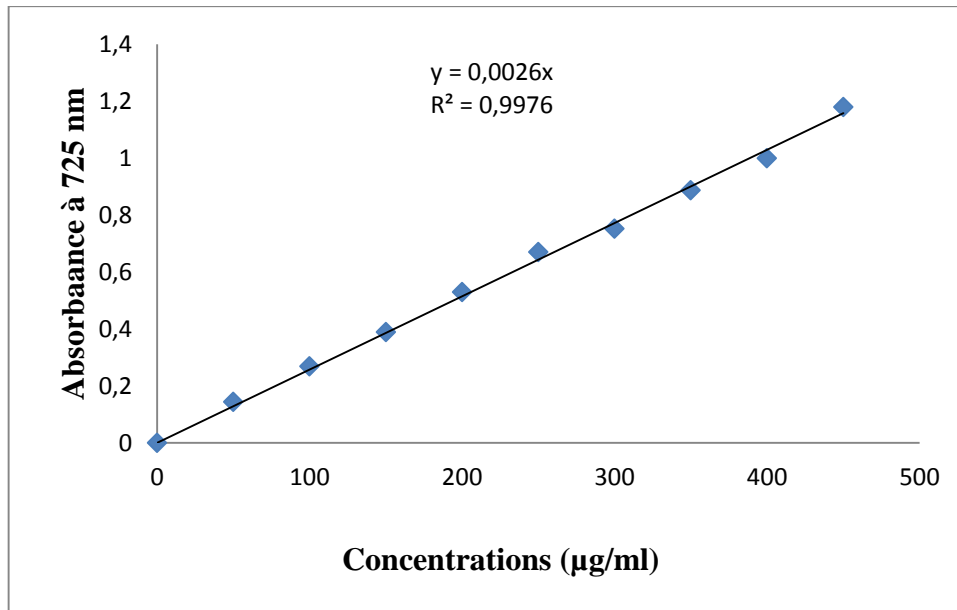


Figure 6: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

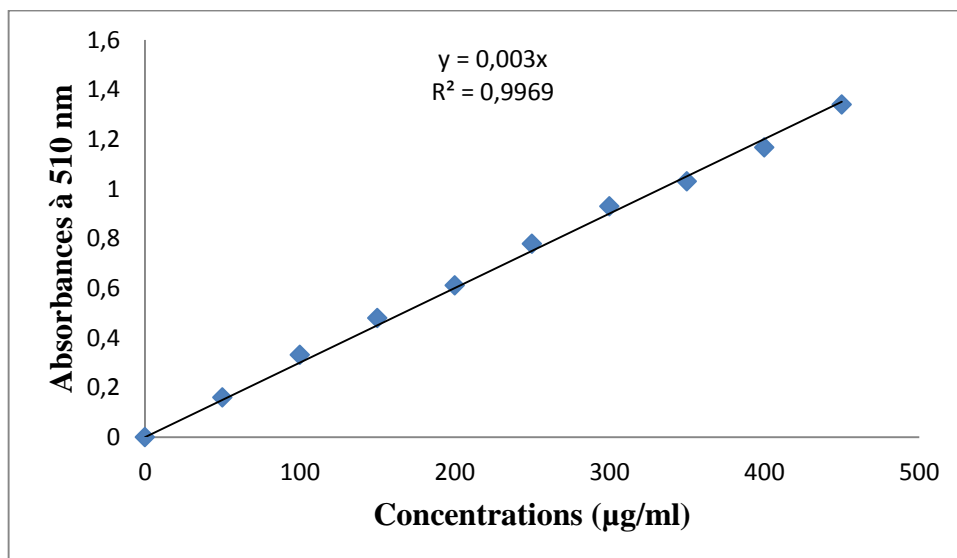


Figure 7: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux

Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent de l'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/mg E}$) pour les polyphénols totaux et en microgramme équivalent de la catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC/mg E}$) pour les flavonoïdes totaux. Ils sont représentés dans le tableau 8:

Tableau 8 : Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des extraits de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus*

<i>M.pulegium</i>			<i>S. chamaecyparissus</i>		
Extrait/ Fraction	Polyphénols ($\mu\text{g EAG/mg E}$)	Flavonoïdes ($\mu\text{g EC/mg E}$)	Extrait /Fraction	Polyphénols ($\mu\text{g EAG/mg E}$)	Flavonoïdes ($\mu\text{g EC/mg E}$)
EBM	264,24 \pm 0,03	230,75 \pm 0,01	EBS	107,58 \pm 0,10	80,75 \pm 0,04
FAE-M	425,76 \pm 0,00	298,9 \pm 0,00	FAE-S	189,6 \pm 0,67	150,98 \pm 0,08
FnB-M	356,29 \pm 1,06	274,33 \pm 0,00	FnB-S	129,6 \pm 0,51	98,21 \pm 0,00
FED-M	198,31 \pm 1,35	161,42 \pm 1,91	FED-S	100,00 \pm 0,00	72,75 \pm 0,16

M. pulegium : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique. *S. chamaecyparissus* : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique. (\pm) : Moyenne Erreur Standard (MES) (n=3).

D'après les résultats obtenus, nous avons noté que les fractions FAE-M et Fn-B-M de *M.pulegium* ont présenté les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux qui sont de l'ordre de 425,76 \pm 0,00 et 356,29 \pm 1,06 $\mu\text{g EAG/mg E}$, et en flavonoïdes totaux qui sont de l'ordre de 298,9 \pm 0,00 et 274,33 \pm 0,00 $\mu\text{g EC/mg E}$, respectivement (**Tableau 8**). Pour *S. chamaecyparissus*, nous avons constaté que les deux fractions FAE-S et Fn-B-S ont présenté également les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux qui sont de l'ordre de 189,6 \pm 0,67 et 129,6 \pm 0,51 $\mu\text{g EAG/mg E}$, et en flavonoïdes de l'ordre de 150,98 \pm 0,08 et 98.21 \pm 0,00 $\mu\text{g EC/mg E}$, respectivement. Cependant, la fraction éther diéthylique des deux plantes a enregistré les teneurs les plus faibles.

3. Identification des composés phénoliques par RP- HPLC-PDA

Les fractions acétate d'éthyle (FAE-M et FAE-S) et n-Butanol (Fn-B-M et Fn-B-S) des deux plantes étudiées, qui ont présentées des teneurs élevées en composés phénoliques, ont fait l'objet d'analyses chromatographiques par RP- HPLC-PDA.

Les profils chromatographiques qualitatifs obtenus de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* montrent des différences dans la composition en composés phénoliques entre les différents extraits analysés.

L'analyse chromatographique par RP-HPLC-PDA de composés phénoliques contenus dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanol obtenues à partir de l'extrait brut hydrométhanolique de *M. pulegium* a révélé la présence d'acides phénoliques (acide gallique, acide *p*-coumarique et acide férulique), de flavanone (naringénine) et de flavonol (quercétine) (**Figure 8 et 9**).

L'acide gallique, la *p*-coumarique et la quercétine ont été détectés dans les deux fractions, dont la quercétine est le composé majoritaire.

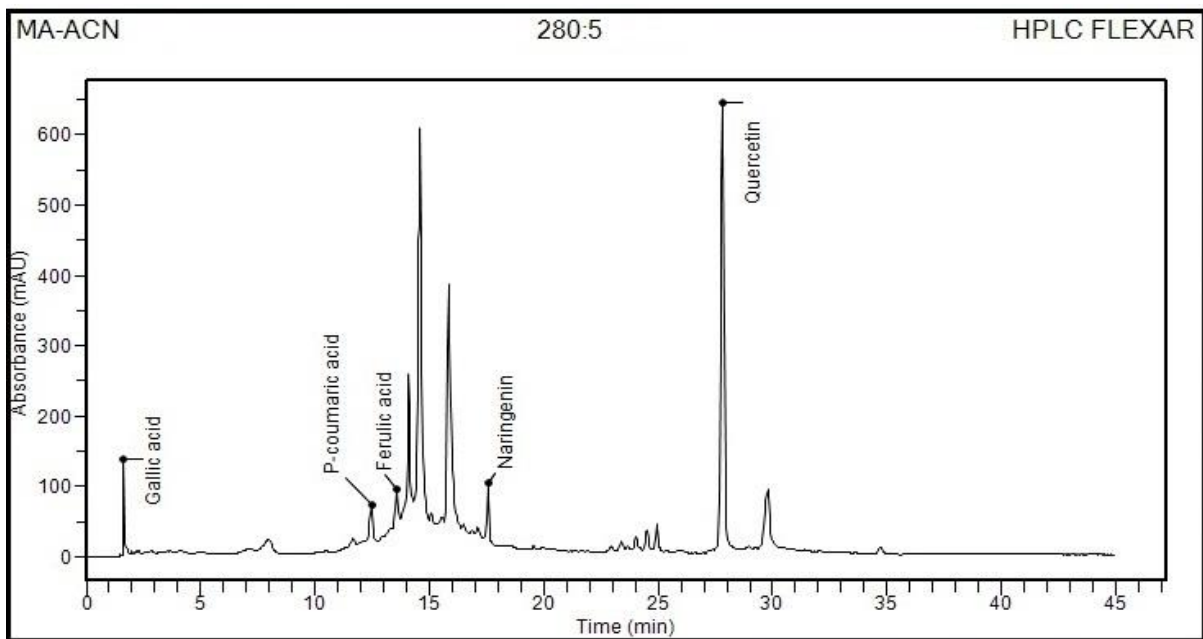


Figure 8 : Chromatogramme de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique de *M. pulegium* préparé par macération

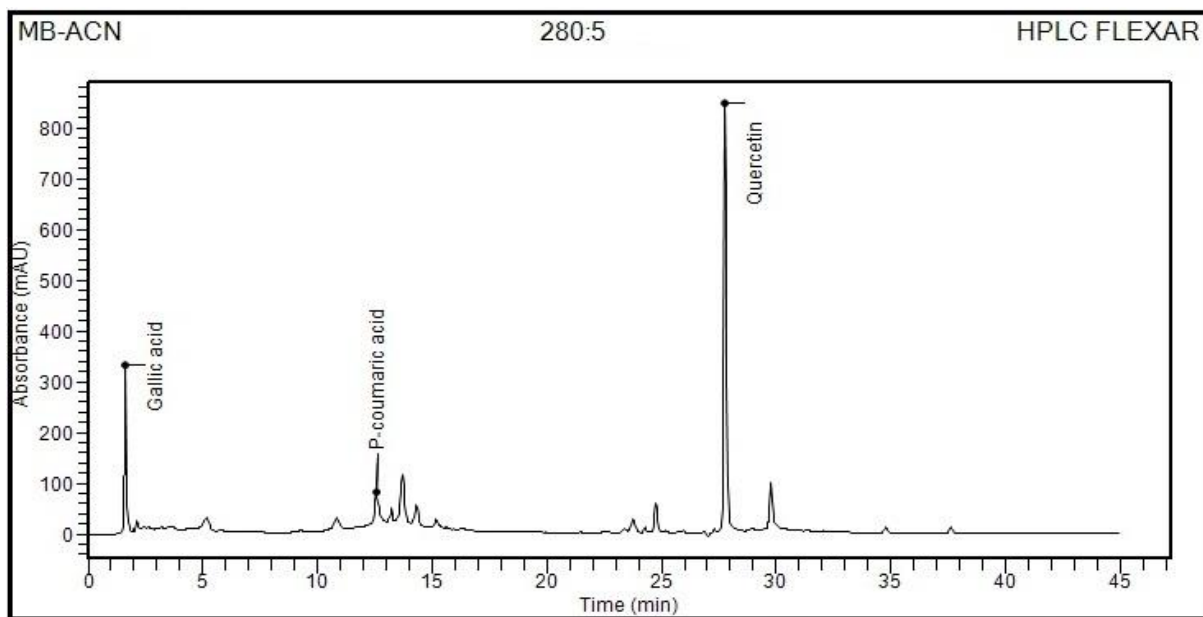


Figure 9 : Chromatogramme de la fraction n-butanol de l'extrait brut hydrométhanolique de *M. pulegium* préparé par macération

Par ailleurs, Les profils chromatographiques qualitatifs obtenus à 280 nm pour les fractions acétate d'éthyle et n-butanol de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* sont illustrés dans les figures 10 et 11.

Les résultats obtenus montrent la présence de plusieurs molécules dont trois flavonoïdes (naringénine, quercétine, et rutine) et un acide phénolique (acide gallique). La quercétine est le composé majoritaire dans des deux fractions. La rutine a été identifiée uniquement dans la fraction acétate d'éthyle (FAE-S).

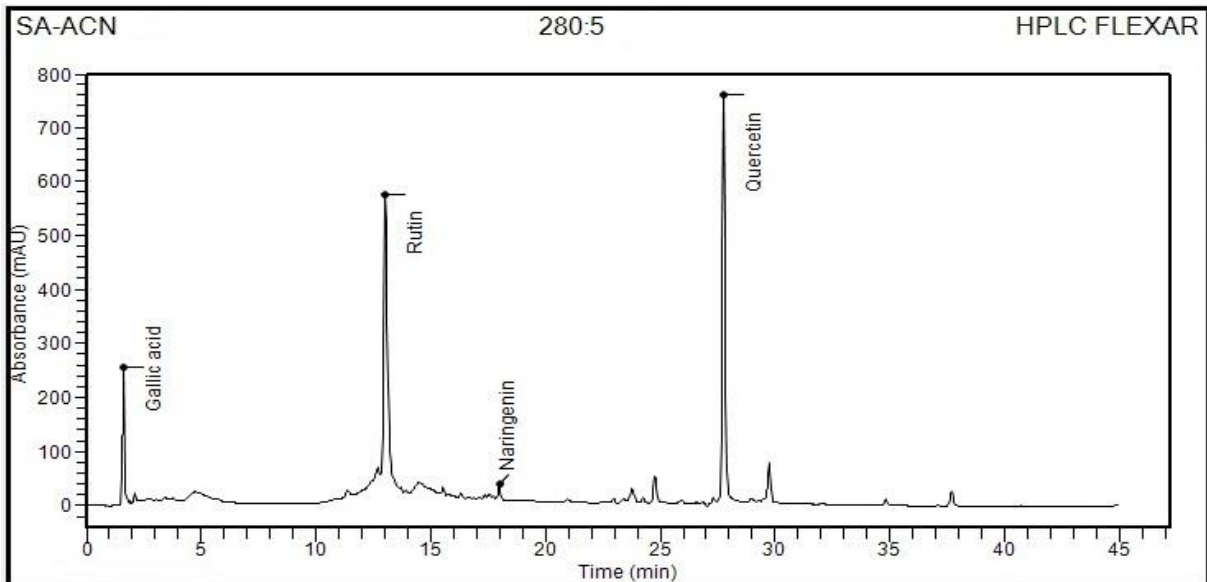


Figure 10: Chromatogramme de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique de *S. chamaecyparissus* préparé par macération

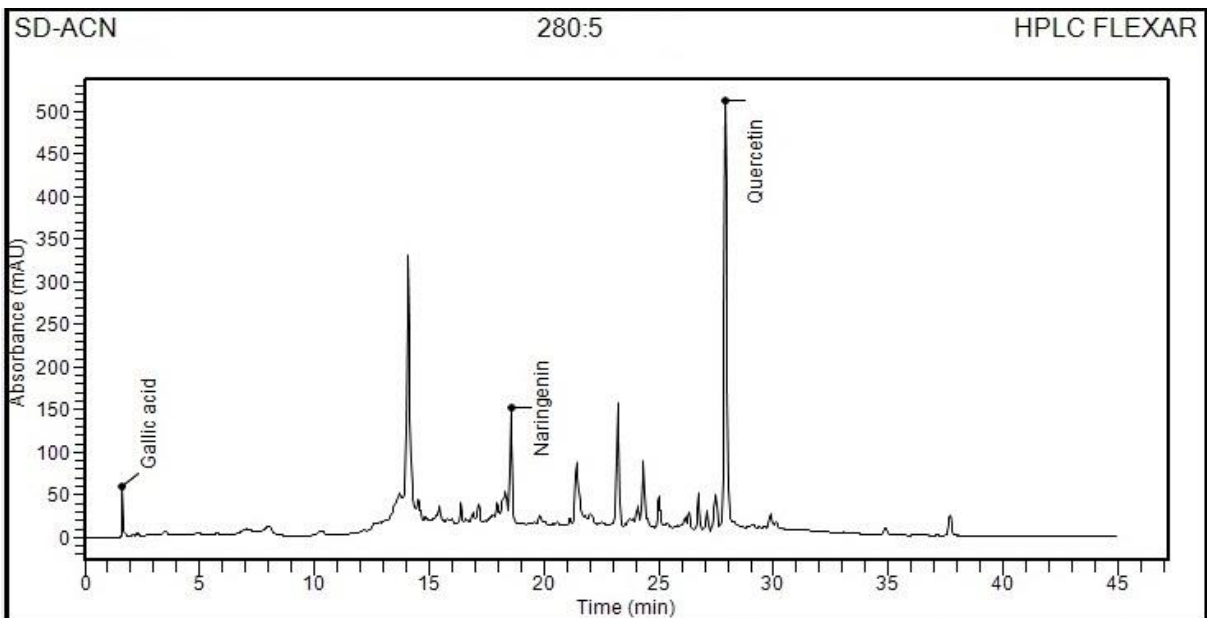


Figure 11 : Chromatogramme de la fraction n-butanol de l'extrait brut hydrométhanolique *S. chamaecyparissus* préparé par macération

III. Etude Biologique

1. Evaluation de la cytotoxicité des extraits vis-à-vis des globules rouges

Dans la présente étude nous avons étudié la toxicité *in vitro* de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* et ses fractions riches en composés phénoliques vis-à-vis des cellules érythrocytaires humains en se basant sur leurs effets hémolytiques.

Les figures 12 et 13 présentent l'évolution des taux d'hémolyse après 60 min d'incubation d'une suspension érythrocytaire à 37°C en présence des différentes concentrations des extraits bruts hydrométhanoliques de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* et de leurs fractions.

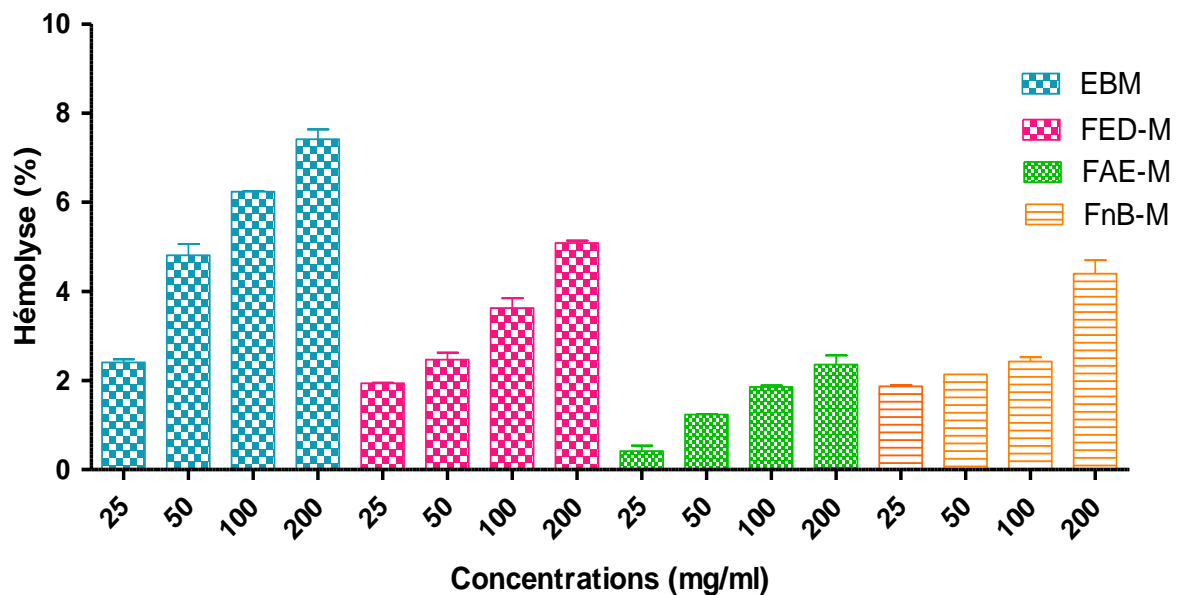


Figure 12: Taux d'hémolyse après 60 min d'incubation d'une suspension érythrocytaire à 37°C en présence des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *M. pulegium* préparé par macération et ses fractions.

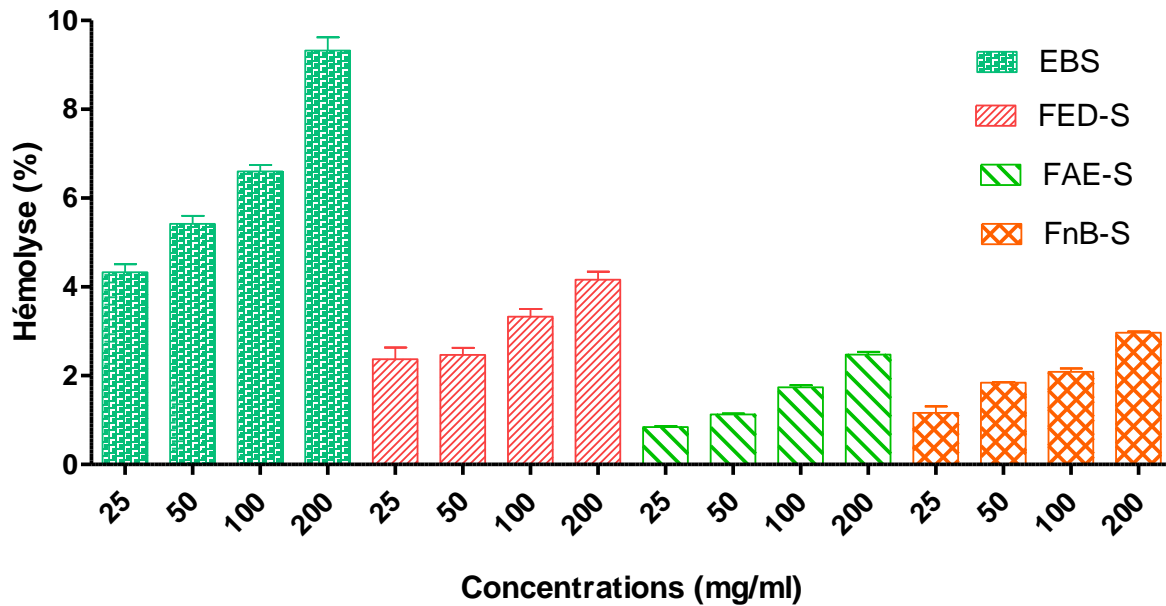


Figure 13: Taux d'hémolyse après 60 min d'incubation d'une suspension érythrocytaire à 37°C en présence des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* préparé par macération et ses fractions.

Les résultats obtenus ont montré que les taux d'hémolyses sont proportionnels à l'augmentation des concentrations des extraits de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus*. Après 60 min d'incubation à 37 °C et pour toutes les concentrations testées, les taux sont compris entre $2,40 \pm 0,03$ % et $7,41 \pm 0,12$ % pour l'extrait brut (EBM) et entre $1,94 \pm 0,00$ % et $5,08 \pm 0,03$ % pour la fraction éther diéthylique (FED-M), et entre $0,41 \pm 0,07$ % et $2,36 \pm 0,12$ % pour la fraction acétate d'éthyle (FAE-M) et entre $1,87 \pm 0,01$ % et $4,4 \pm 0,17$ % pour la fraction n-Butanol (FnB-M) de *M. pulegium*.

Pour *S. chamaecyparissus*, les taux d'hémolyses varient de $4,33 \pm 0,15$ % à $9,32 \pm 0,17$ % pour l'extrait brut (EBS), de $2,37 \pm 0,15$ % à $4,16 \pm 0,10$ % pour la fraction éther diéthylique (FED-S), de $0,84 \pm 0,01$ % à $2,47 \pm 0,03$ % pour la fraction acétate d'éthyle (FAE-S) et de $1,16 \pm 0,08$ % à $2,96 \pm 0,01$ pour la fraction n-Butanol (FnB-S).

De même, nous avons constaté que les fractions acétate d'éthyle des deux plantes ont enregistré les taux d'hémolyses les plus faibles. Ils n'ont pas dépassés $2,36 \pm 0,12$ % pour *M. pulegium* et $2,47 \pm 0,03$ % pour *S. chamaecyparissus* par rapport au témoin positif (hémolyse totale) après 60 min d'incubation en présence d'une concentration de 200 mg/ml.

2. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits et fractions de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* a été évaluée par différentes méthodes : GOR, ABTS, DPPH, superoxyde, PAOT-liquide, FRAP, CUPRAC, phénanthroline, blanchissement du β -carotène. Ils sont basés sur le transfert d'électrons ou d'hydrogène et les résultats sont exprimés en termes de CI_{50} et $A_{0,5}$.

2.1. Piégeage du radical DPPH \cdot

L'activité antiradicalaire des extraits et fractions de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* a été évaluée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH \cdot . Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH \cdot en fonction des concentrations des extraits et des standards. Les CI_{50} obtenues ont été calculées à partir des équations des régressions logarithmiques des courbes tracées (**figure 14 et 15**) et les résultats sont représentés dans le **tableau 9**.

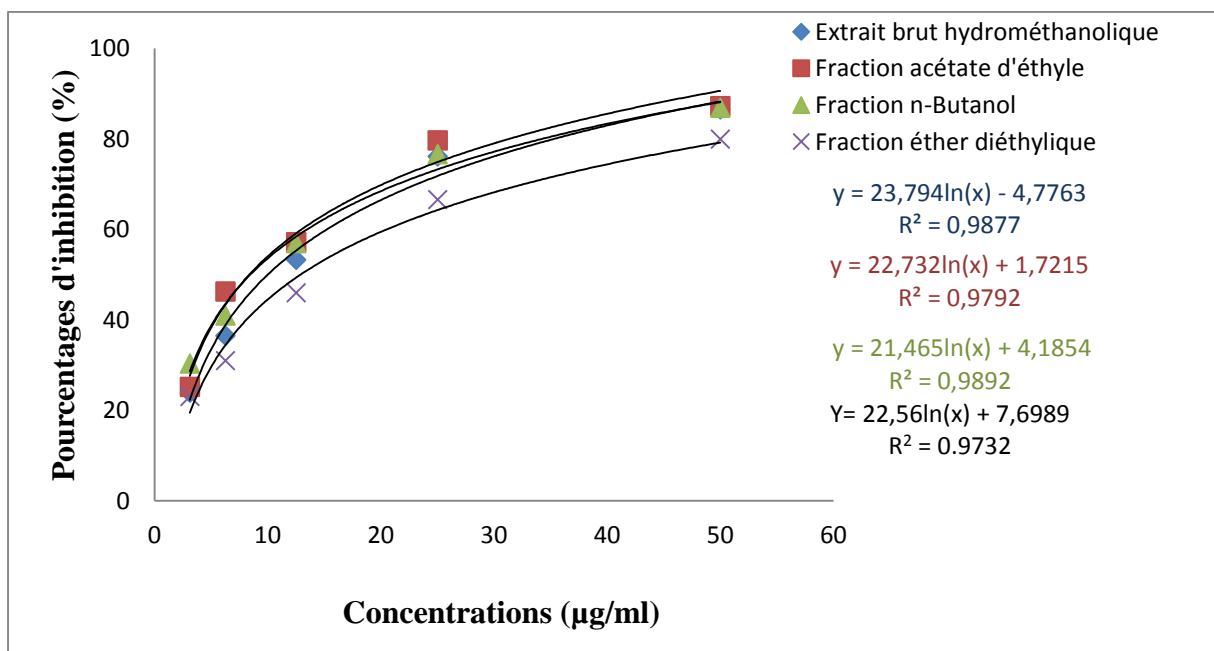


Figure 14: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH \cdot en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*.

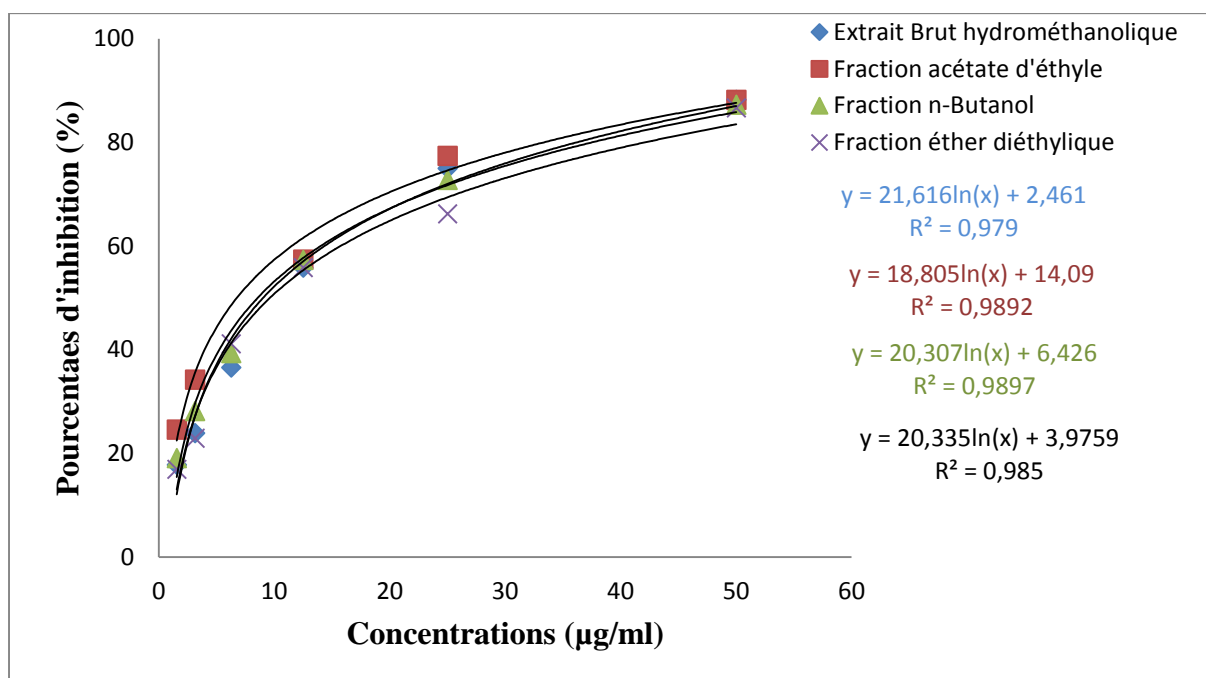


Figure 15: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne *S. chamaecyparissus*

L'ensemble des extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* ont une activité antiradicalaire importante et ceci d'une manière dose-dépendante. A une concentration de 50 µg/ml, l'ensemble des extraits atteignent plus de 80% d'inhibition du DPPH (Figure 14 et 15).

Tableau 9. Les CI₅₀ (µg/ml) des différents extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus*, obtenues par méthode de DPPH.

<i>M. pulegium</i>		<i>S. chamaecyparissus</i>	
EBM	9,99±0,16 ^a	EBS	9,01±0,14 ^a
FED-M	12,90±0,08 ^c	FED-S	9,60±0,03 ^b
FAE-M	8,35±0,22 ^b	FAE-S	6,74±0,09 ^c
FnB-M	8,44±0,03 ^b	FnB-S	8,54±0,01 ^d
BHT	12,99±0,41 ^c	BHT	12,99±0,41 ^e
BHA	6,14±0,41 ^d	BHA	6,14±0,41 ^f
Acide ascorbique	0,91±0,01 ^e	Acide ascorbique	0,91±0,01 ^g

M. pulegium : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique. *S. chamaecyparissus* : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique. (±) : Moyenne Erreur standard (MES) (n=3). ^{a-g} Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à p < 0,05, comme déterminé par les tests à comparaisons multiples de Tukey et Student-Newman-Keul.

La meilleure capacité de piégeage du radical libre DPPH[•] a été enregistrée avec les fractions acétate d'éthyle et n-butanol des deux plantes étudiées avec des valeurs d'CI₅₀ de l'ordre de 8,35 ± 0,22 µg/ml et 8,44 ± 0,03 µg/ml, respectivement pour *M. pulegium* et de l'ordre de 6,74 ± 0,09 µg/ml et 8,54 ± 0,01 µg/ml pour *S. chamaecyparissus*, respectivement (**tableau 9**). Cette activité est meilleure par rapport à celle de l'antioxydant de synthèse BHT (CI₅₀= 12,99 ± 0,41 µg/ml) et très proche à celle de BHA (6,14 ± 0,41 µg/ml).

2.2. Piégeage du radical cationique ABTS^{•+}

L'activité antiradicalaire des extraits et fractions de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* a été effectuée par la méthode de piégeage du radical libre ABTS^{•+}. Nous avons obtenu des courbes logarithmiques à partir desquels nous avons calculé les CI₅₀ et les résultats sont présentés dans le **tableau 10**. Les résultats ont montré une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS^{•+} en fonction des concentrations des différents extraits de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* (**figure 16 et 17**).

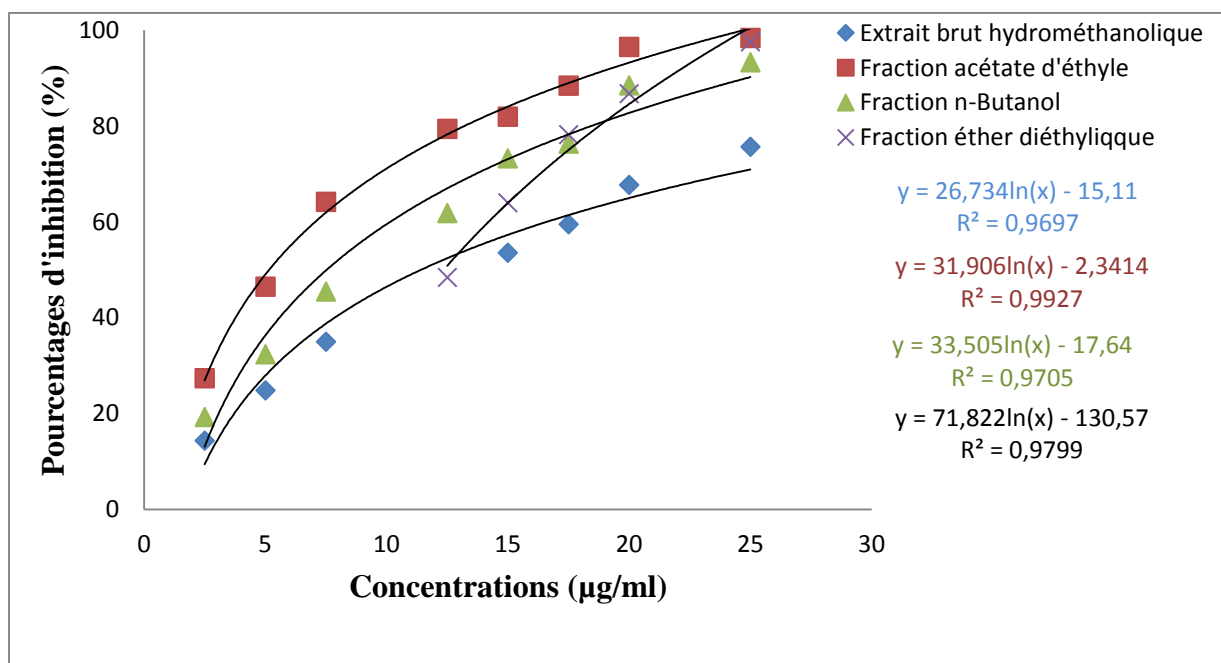


Figure 16: Pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS^{•+} en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*.

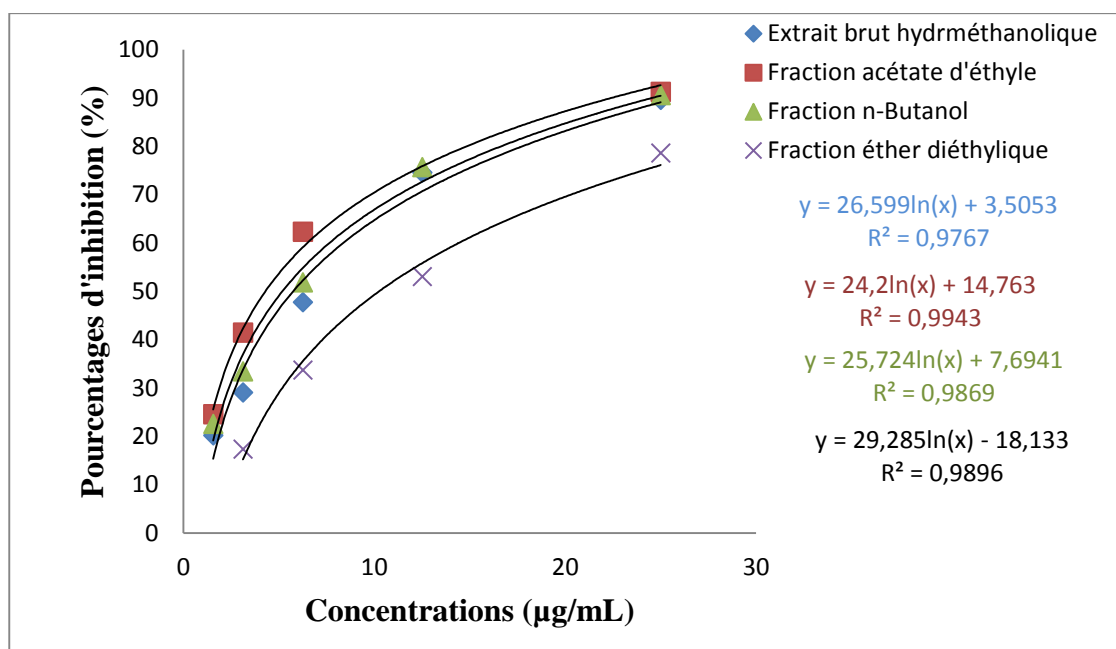


Figure 17: Pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS•+ en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*.

Tableau 10. Les CI_{50} (µg/ml) des différents extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus*, obtenues par méthode de ABTS•+

<i>M. pulegium</i>		<i>S. chamaecyparissus</i>	
EBM	12,37±0,06 ^a	EBS	5,73±0,07 ^a
FED-M	11,41±0,03 ^a	FED-S	10,23±0,00 ^b
FAE-M	5,17±0,08 ^b	FAE-S	4,28±0,04 ^c
FnB-M	8,29±0,82 ^c	FnB-S	5,17±0,13 ^d
BHT	1,59±0,03 ^d	BHT	1,59±0,03 ^e
BHA	1,03±0,00 ^d	BHA	1,03±0,00 ^e
Trolox	7,76±0,03 ^c	Trolox	7,76±0,03 ^f

M. pulegium : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique. *S. chamaecyparissus* : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique. (±) : Moyenne erreur standard (MES) (n=3). ^{a-f} Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à $p < 0,05$, comme déterminé par les tests à comparaisons multiples de Tukey et Student-Newman-Keul.

Nous avons constaté que les fractions acétate d'éthyle et n-butanol des deux plantes étudiées ont présenté l'activité antiradicalaire la plus puissante avec des CI_{50} de l'ordre de $5,17 \pm 0,08$ et $8,29 \pm 0,82$ µg/ml pour *M. pulegium* et de l'ordre de $4,28 \pm 0,04$ et $5,17 \pm 0,13$ µg/ml pour *S. chamaecyparissus*, respectivement. Cette activité est supérieure à celle de Trolox et proche à celle de BHA et BHT.

2.3. Piégeage du radical galvinoxyl (GOR)

Le pouvoir piègeur du radical galvinoxyl par les différents extraits de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* a été évalué. Les figures 18 et 19 montrent les pourcentages d'inhibition du radical galvinoxyl en fonction des différentes concentrations des extraits de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus*. Les CI₅₀ sont illustrées dans le tableau 11.

Nous avons remarqué que l'ensemble des extraits ont une activité de piégeage du radical galvinoxyl importante et ceci d'une manière dose-dépendante.

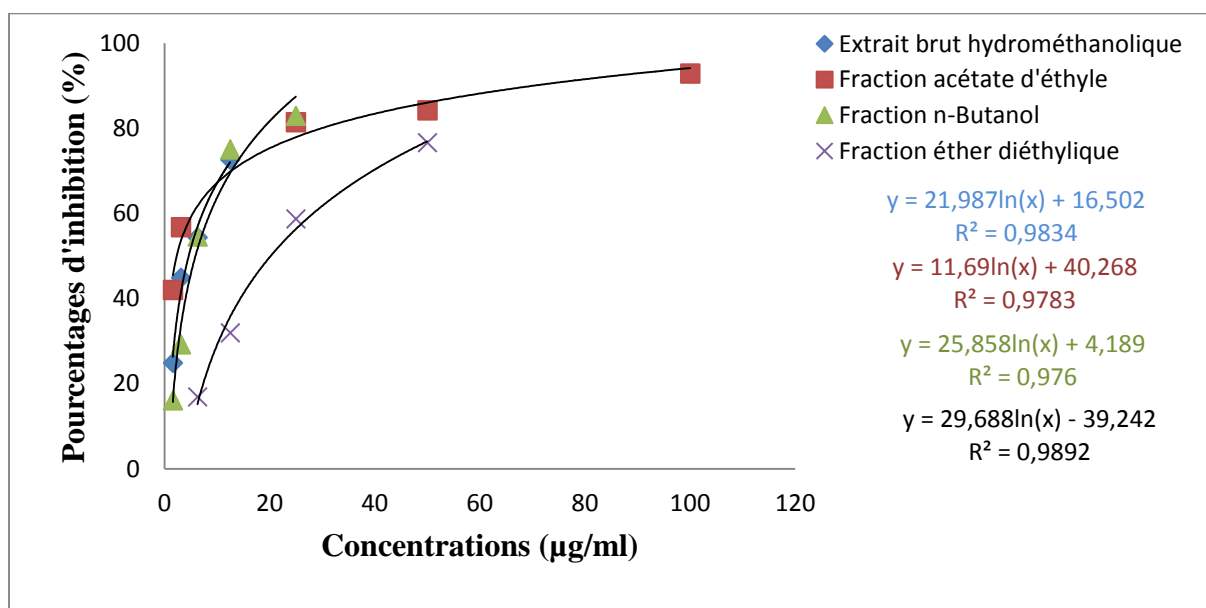


Figure 18: Pourcentages d'inhibition du radical galvinoxyl en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*

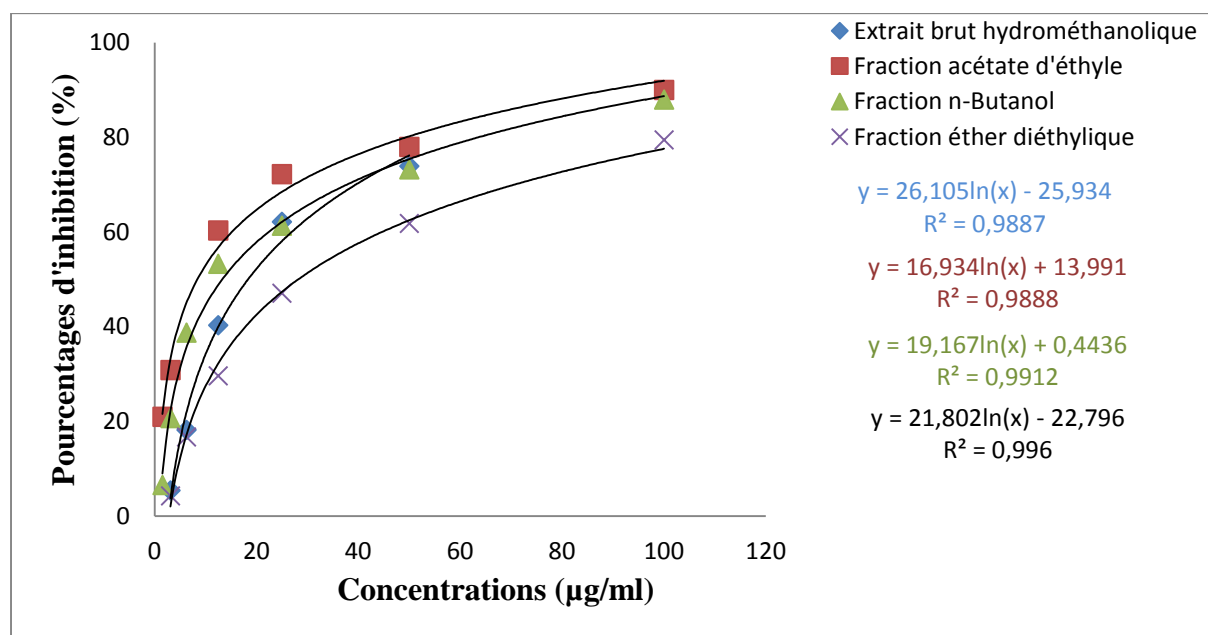


Figure 19: Pourcentages d'inhibition du radical galvinoxyl en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*.

Tableau 11. Les CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) des différents extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus*, obtenues par méthode du piégeage du radical galvinoxyl.

<i>M. pulegium</i>		<i>S. chamaecyparissus</i>	
EBM	$5,87 \pm 0,03^a$	EBS	$18,33 \pm 0,29^a$
FED-M	$20,20 \pm 0,02^c$	FED-S	$28,36 \pm 0,62^b$
FAE-M	$2,29 \pm 0,01^b$	FAE-S	$8,38 \pm 0,01^c$
FnB-M	$5,67 \pm 1,08^a$	FnB-S	$13,26 \pm 0,35^d$
BHT	$3,32 \pm 0,18^{b,d}$	BHT	$3,32 \pm 0,18^e$
BHA	$5,38 \pm 0,06^{a,d}$	BHA	$5,38 \pm 0,06^f$

M. pulegium : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique. *S. chamaecyparissus* : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique. (\pm) : Moyenn erreur standard (MES) (n=3). ^{a-f} Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à $p < 0,05$, comme déterminé par les tests à comparaisons multiples de Tukey et Student-Newman-Keul.

Les résultats illustrés dans le tableau 11 révèlent que la fraction FAE-M ($CI_{50} = 2,29 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$), la fraction FnB-M ($CI_{50} = 5,67 \pm 1,08 \mu\text{g/ml}$) et l'extrait brut hydrométhanolique EBM ($CI_{50} = 5,87 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$) ont montré une capacité de piégeage du radical galvinoxyl significativement similaire à celle des molécules standards BHT ($CI_{50} = 3,32 \pm 0,18 \mu\text{g/ml}$) et BHA ($CI_{50} = 5,38 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$).

Par ailleurs, pour la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*, nous avons enregistré que la fraction FAE-S est la plus active avec une CI_{50} de l'ordre de $8,38 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ et la fraction FED-S possède l'activité la plus faible avec une CI_{50} de l'ordre de $28,36 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$.

2.4. Piégeage du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

Le pouvoir piègeur du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) par les différents extraits de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* a été évalué. Les pourcentages d'inhibition du radical superoxyde et les CI_{50} sont illustrés dans les figures 20, 21 et le tableau 12, respectivement.

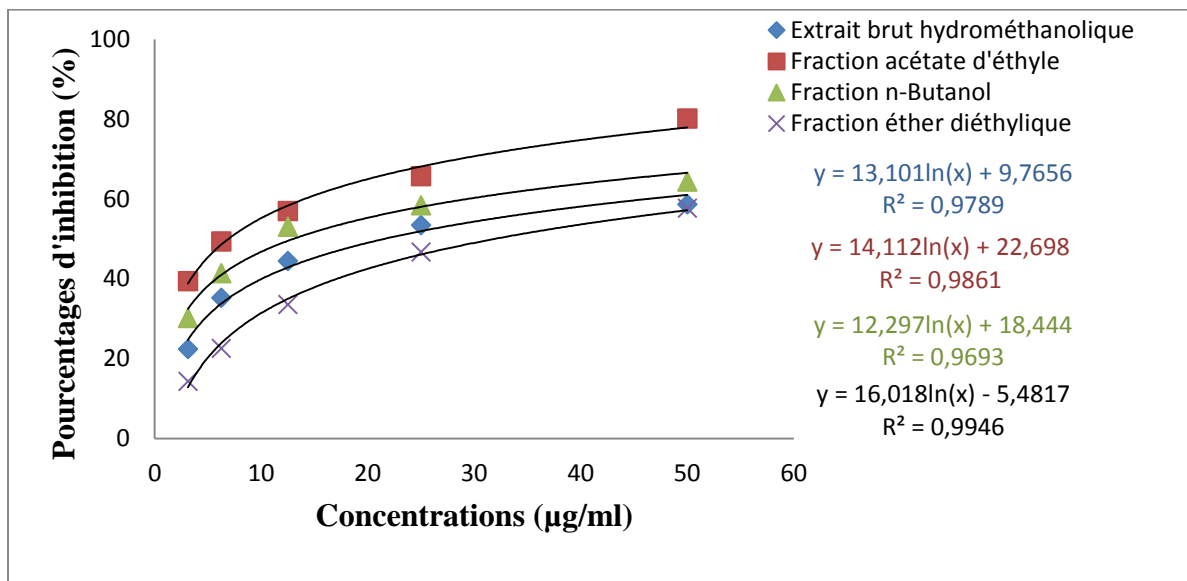


Figure 20: Pourcentages d'inhibition du radical superoxyde en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*.

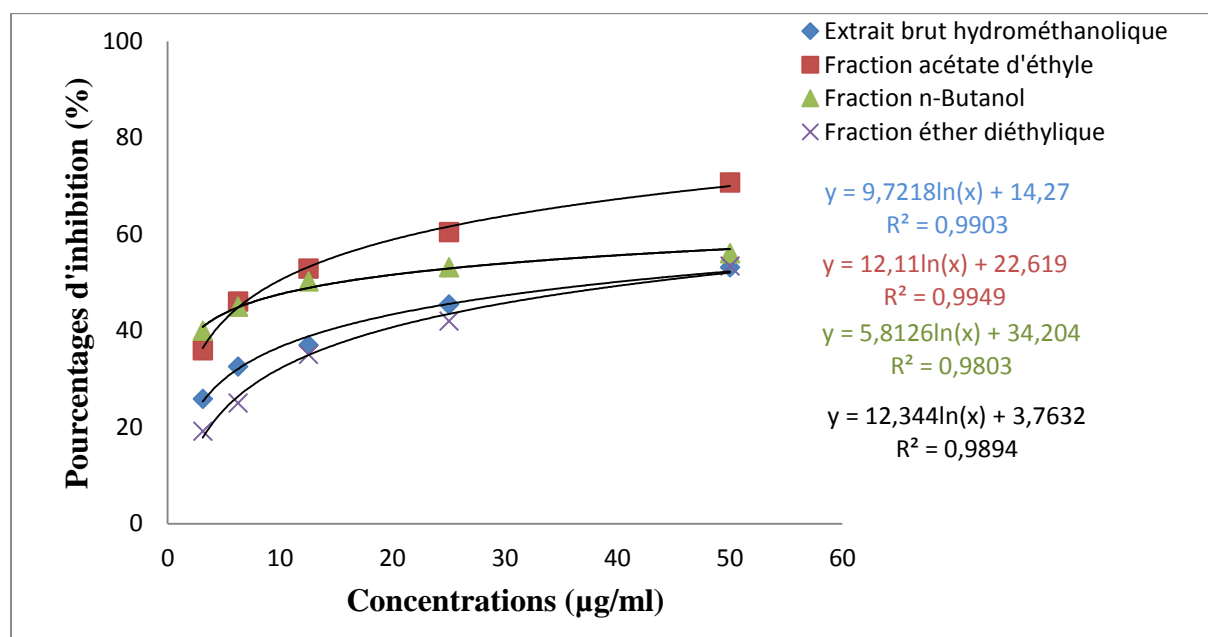


Figure 21: Pourcentages d'inhibition du radical superoxyde en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*.

Tableau 12. Les CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) des différents extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus*, obtenues par méthode de piégeage de radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$.

<i>M. pulegium</i>		<i>S. chamaecyparissus</i>	
EBM	21,56±0,14 ^a	EBS	39,84±1,19 ^a
FED-M	31,93±0,38 ^b	FED-S	42,38±1,22 ^b
FAE-M	7,01±0,03 ^c	FAE-S	9,34±2,38 ^c
FnB-M	13,01±0,02 ^d	FnB-S	15,13±0,00 ^d
BHT	28,69±0,00 ^e	BHT	28,69±0,00 ^e
Acide ascorbique	10,86±0,12 ^f	Acide ascorbique	10,86±0,12 ^f

M. pulegium : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique. *S. chamaecyparissus* : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique. (\pm) : Moyenne Erreur Standard (MES) (n=3). ^{a-f} Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à $p < 0,05$, comme déterminé par les tests à comparaisons multiples de Tukey et Student-Newman-Keul.

A partir des résultats obtenus, nous avons constaté que l'ensemble des extraits ont une activité de piégeage du radical superoxyde importante et ceci d'une manière dose-dépendante. La meilleure activité de piégeage de radical superoxyde a été enregistrée dans la fraction acétate d'éthyle de *M. pulegium* (FAE-M) et de *S. chamaecyparissus* (FAE-S) avec des valeurs de CI_{50} respectives de l'ordre de $7,01 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ et $9,34 \pm 2,38 \mu\text{g/ml}$ avec un

pourcentage d'inhibition supérieur de 80 % pour *M. pulegium* et supérieur de 70% pour *S. chamaecyparissus*. Cette activité est plus importante que celle du BHT ($28,69 \pm 0,00$) et de l'acide ascorbique ($10,86 \pm 0,12$). La fraction n-butanol des deux plantes étudiées a exercée un pouvoir piègeur supérieur à celui BHT et très proche de l'acide ascorbique. Par contre les fractions d'éther diéthylique (FED-M et FED-S) ont montré l'activité de piégeage du radical superoxyde la plus faible.

Nous avons tracé une courbe de corrélation linéaire entre les valeurs de CI_{50} des différents tests antiradicalaires (DPPH, ABTS, GOR et superoxyde) et les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits et fractions de *M. pulegium* (figure 22) et *S. chamaecyparissus* (figure 23).

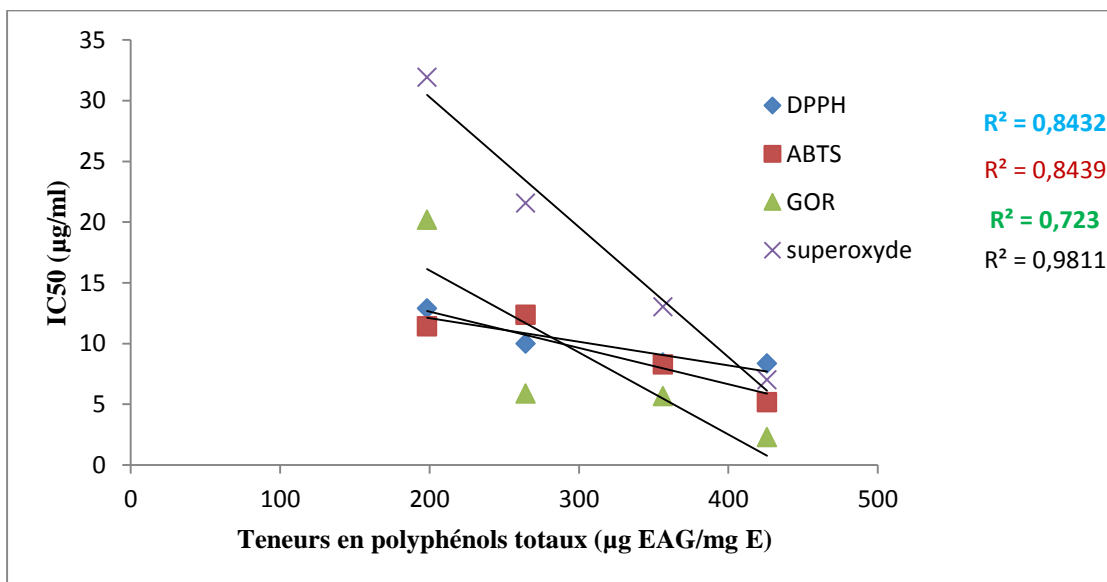


Figure 22: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI_{50} des différents tests antiradicalaires des différentes fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*.

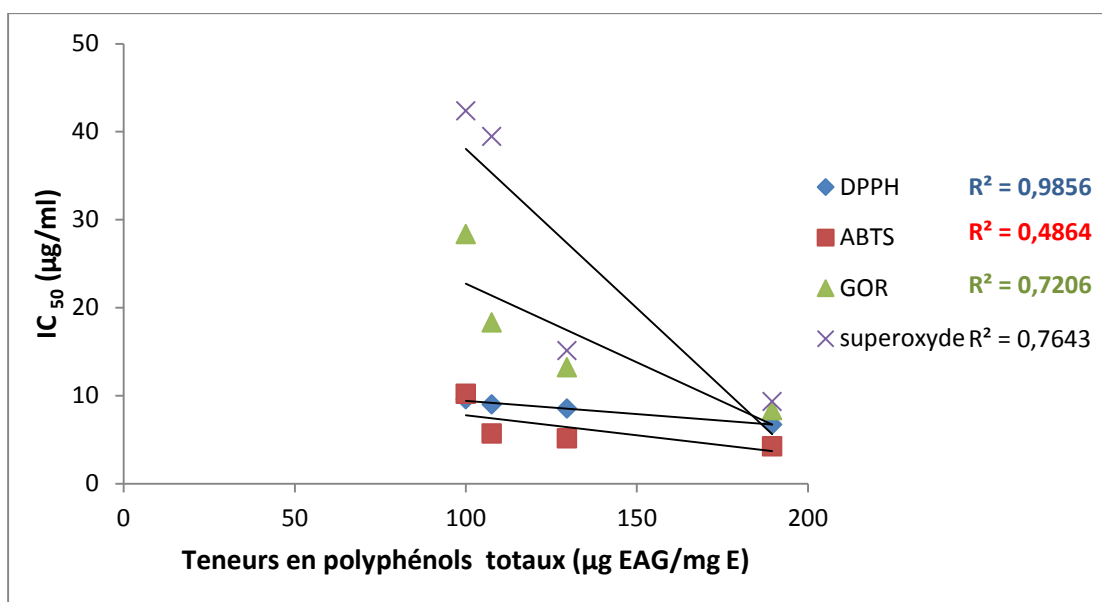


Figure 23: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les IC_{50} des différents tests antiradicaux des différentes fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*

D'après les résultats obtenus nous avons remarqué l'existence d'une forte corrélation (R^2 entre 0,72 et 0,98) entre l'activité antiradicalaire des différents extraits et fractions de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* et leurs contenus en polyphénols totaux. Cependant une faible corrélation ($R^2 = 0,486$) a été estimée entre le test ABTS et les teneurs en polyphénols des différents extraits et fractions de *S. chamaecyparissus*.

2.5. Test PAOT-Liquide ®

L'activité antioxydante totale estimée par le Test de la PAOT-Liquide ® des extraits bruts hydrométhanoliques de la partie aérienne de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* et de leurs fractions riches en composés phénoliques a montré que l'ensemble des extraits étudiés ont un pouvoir antioxydant puissant (figure 24). La fraction FAE-M a enregistré le meilleur score PAOT-Liquide ® (**Score : 8478**), comparable à celui des standards (Score > 6000, selon l'échelle PAOT-Score Scale ®, Ingredients), ce qui signifie le pouvoir antioxydant total le plus puissant suivi par FnB-M (**Score : 5630**), EBM (**Score : 4022**) et FED-M (**Score : 3407**). Pour *S. chamaecyparissus*, FAE-S a présenté l'activité la plus élevée (**Score : 4576**) tandis que FED-S présente l'activité la plus faible (**Score : 1918**).

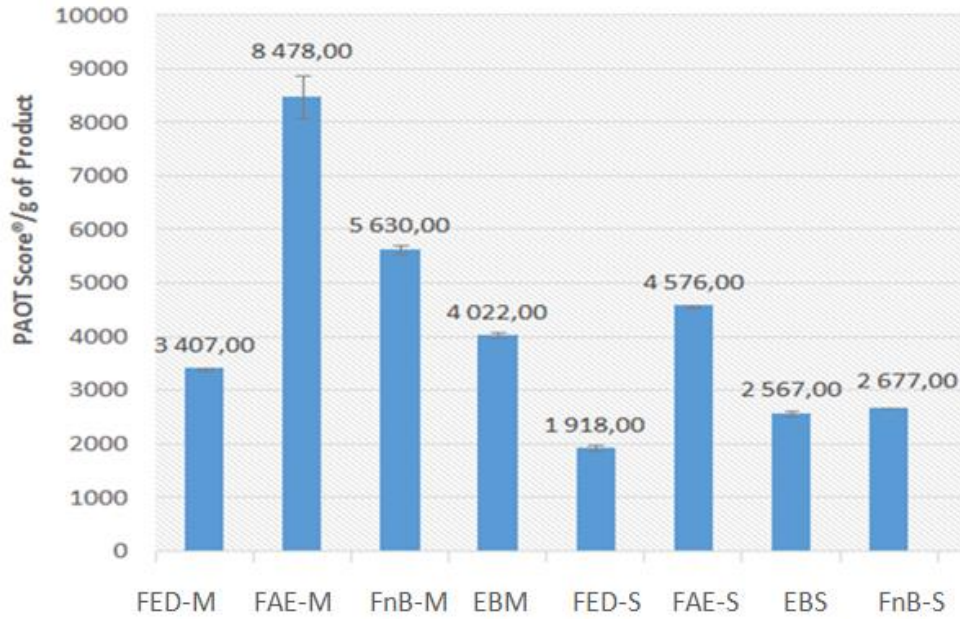


Figure 24: PAOT Score ® des extraits bruts hydrométhanoliques de la partie aérienne de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* et de leurs fractions riches en composés phénoliques

2.6. Pouvoir réducteur du cuivre (CUPRAC)

Les **figures 25 et 26** montrent les résultats de la capacité de réduction du cuivre des extraits de la plante *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus*. Les résultats ont été exprimés en valeurs $A_{0,5}$ (concentration de l'échantillon donnant une absorbance de 0,5) (**Tableau 13**).

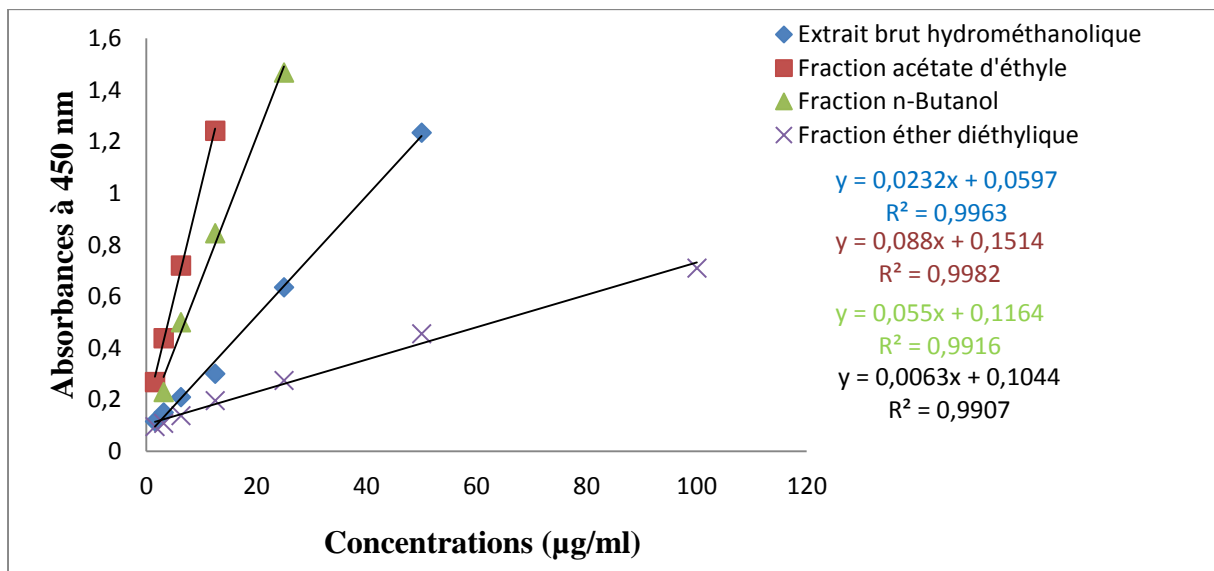


Figure 25: Capacité de réduction du cuivre en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *M. pulegium* (CUPRAC).

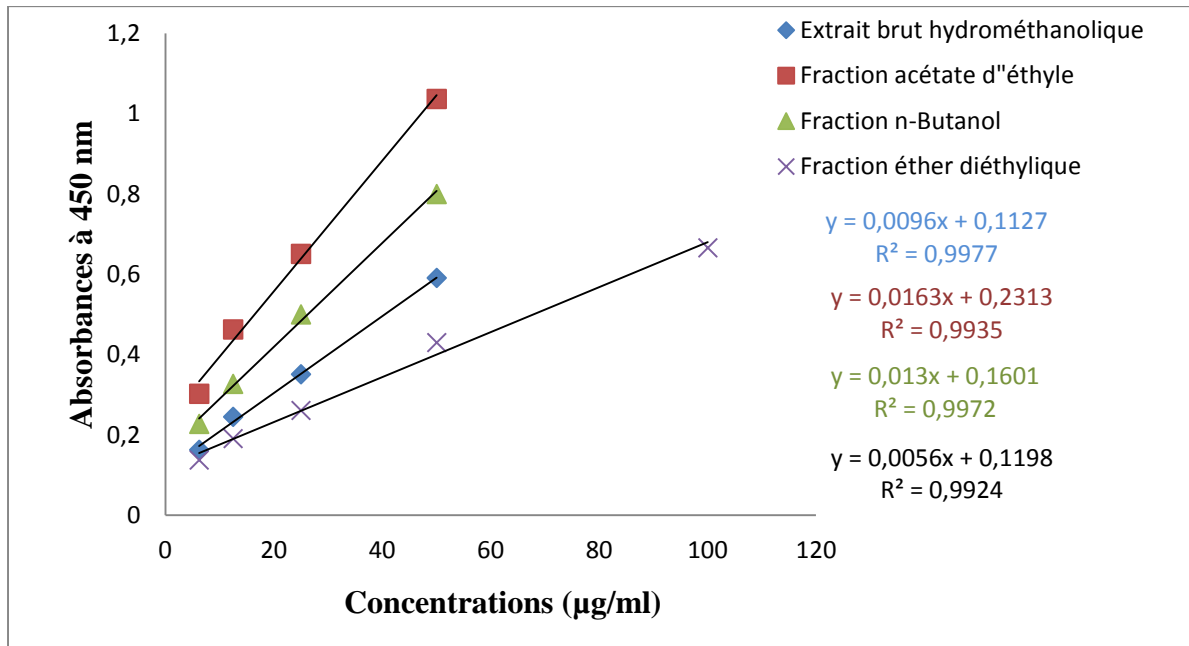


Figure 26: Capacité de réduction du cuivre en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* (CUPRAC).

Tableau 13. Les $A_{0,5}$ (µg/ml) des différents extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus*, obtenues par méthode de CUPRAC

<i>M. pulegium</i>		<i>S. chamaecyparissus</i>	
EBM	20,00±0,00 ^a	EBS	40,48±0,10 ^a
FED-M	66,96±0,44 ^d	FED-S	68,29±0,01 ^b
FAE-M	3,93±0,19 ^b	FAE-S	16,47±0,34 ^c
FnB-M	11,8±0,05 ^c	FnB-S	26,19±0,21 ^d
BHT	3,44 ± 0,04 ^b	BHT	3,44 ± 0,04 ^e
BHA	1,34 ± 0,11 ^e	BHA	1,34 ± 0,11 ^f

M. pulegium : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique. *S. chamaecyparissus* : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique. (±) : Moyenne Erreur Standard (MES) (n=3). ^{a-f} Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à $p < 0,05$, comme déterminé par les tests à plages multiples de Tukey et Student-Newman-Keul.

Nous avons observé que la capacité de réduction du cuivre est proportionnelle à l'augmentation des concentrations des extraits étudiés. Pour *M. pulegium*, la fraction acétate d'éthyle (FAE-M) a présenté la plus forte activité avec une $A_{0,5}$ de l'ordre de 3,93±0,19 (µg/ml). Cette activité est significativement similaire à celle de BHT et très proche à celle de BHA.

L'ordre de réduction du cuivre est le suivant : fraction éther diéthylique < extrait brut hydrométhanolique < fraction n-Butanol < fraction acétate d'éthyle. Le même ordre a été observé pour *S. chamaecyparissus*.

2.7. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur du fer se traduit par la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}), en présence d'antioxydants existants dans l'extrait testé. Les valeurs des absorbances obtenues ont permis de tracer des courbes de régressions linéaires (**figure 27 et 28**) et de calculer ainsi les $A_{0.5}$ (**tableau 14**) à partir des équations des courbes correspondantes.

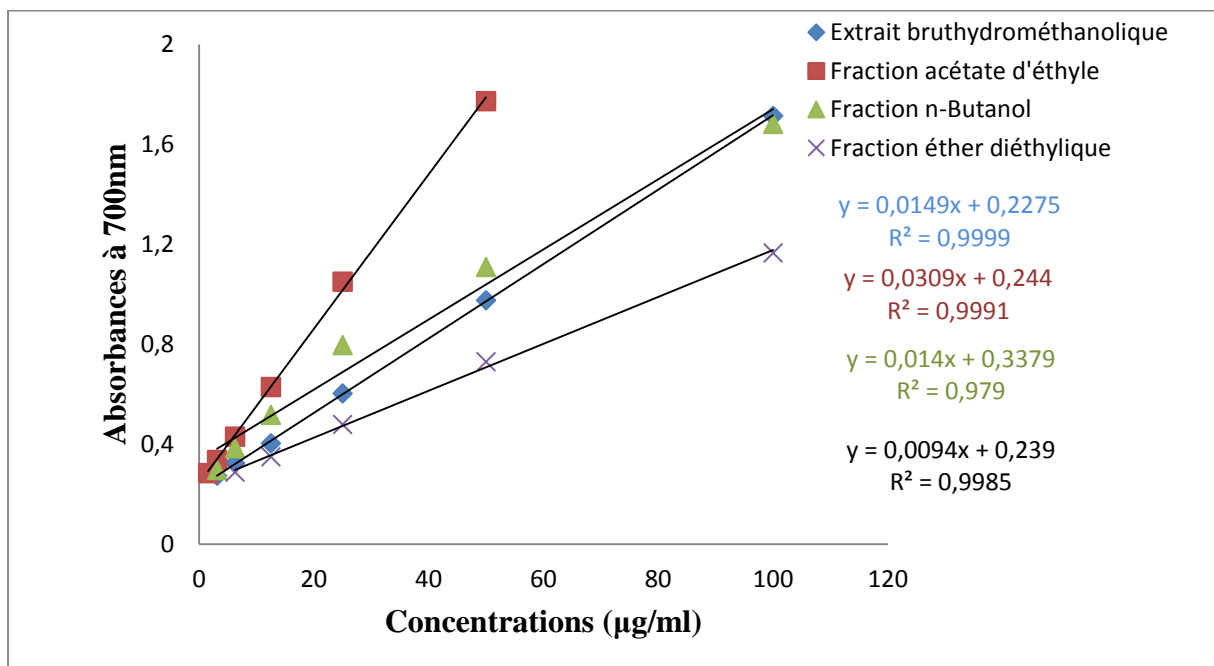


Figure 27: Pouvoir réducteur de fer en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *M. pulegium* (FRAP).

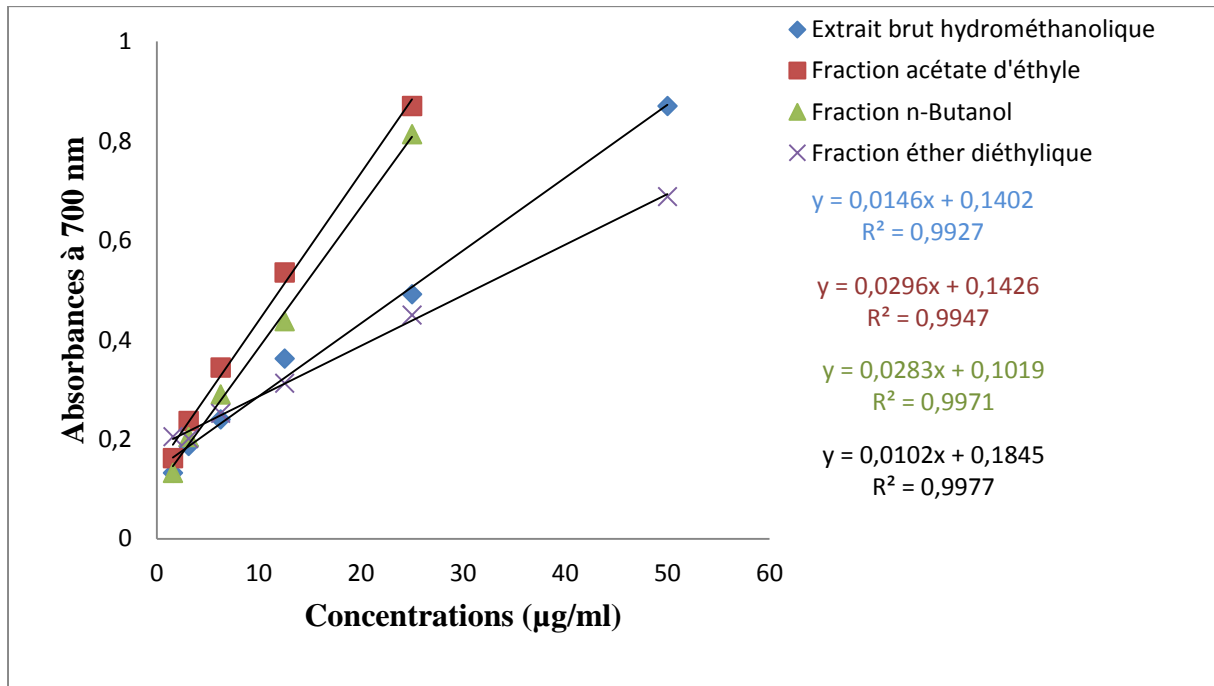


Figure 28: Pouvoir réducteur de fer en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* (FRAP).

Tableau 14. Les $A_{0,5}$ (µg/ml) des différents extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus*, obtenues par méthode de FRAP

<i>M. pulegium</i>		<i>S. chamaecyparissus</i>	
EBM	11,54 ± 0,36 ^a	EBS	24,53±0,08 ^a
FED-M	18,28 ± 0,21 ^d	FED-S	30,95±0,06 ^b
FAE-M	8,29 ± 0,21 ^b	FAE-S	12,07±0,06 ^c
FnB-M	10,14 ± 0,43 ^c	FnB-S	14,26±0,70 ^c
Acide ascorbique	6,77 ± 1,15 ^e	Acide ascorbique	6,77 ± 1,15 ^d
Acide tannique	5,39 ± 0,91 ^f	Acide tannique	5,39 ± 0,91 ^d
α-Tocophérol	34,93 ± 2,38 ^g	α-Tocophérol	34,93 ± 2,38 ^f

M. pulegium : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique. *S. chamaecyparissus* : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique. (±) : Moyenne Erreur Standard (MES) (n=3). ^{a-g} Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à $p < 0,05$, comme déterminé par les tests à plages multiples de Tukey et Student-Newman-Keul.

Les résultats ont montré une augmentation proportionnelle du pouvoir réducteur en fonction des concentrations des extraits étudiés. Les extraits préparés de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* ont marqué un pouvoir réducteur du fer intéressant qui est supérieur à celui de l'α-tocophérol. Par ailleurs, le pouvoir réducteur du fer le plus élevé est assigné à la fraction

FAE-M du *M. pulegium* ($A_{0,5} = 8,29 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$) et la fraction FAE-S du *S.chamaecyparissu* ($A_{0,5} = 12,07 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$) avec un pouvoir réducteur très proche à celui de l'acide ascorbique et l'acide tannique.

2.8. Pouvoir réducteur du fer (Phénanthroline)

A partir des valeurs obtenues nous avons tracé des courbes de régressions linéaires (**figures 29 et 30**). Les $A_{0,5}$ ont été calculés, ainsi, à partir des équations des courbes correspondant (**Tableau 15**).

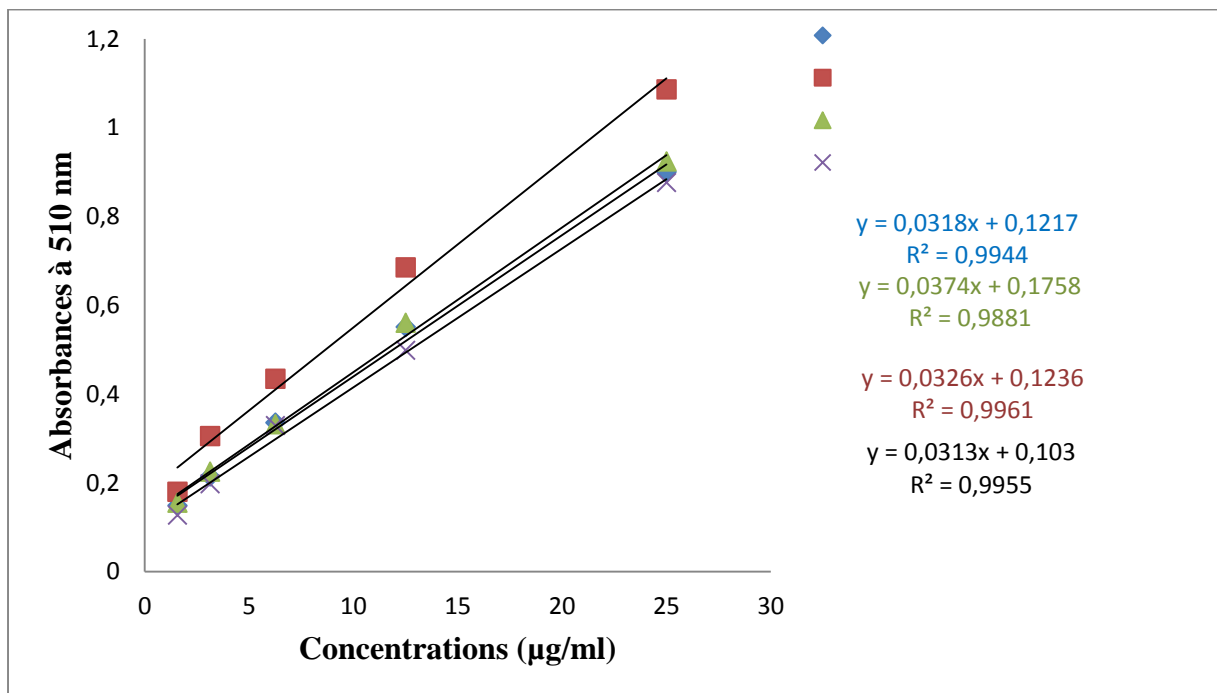


Figure 29: Test de l'activité antioxydante par la méthode de Phénanthroline de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*

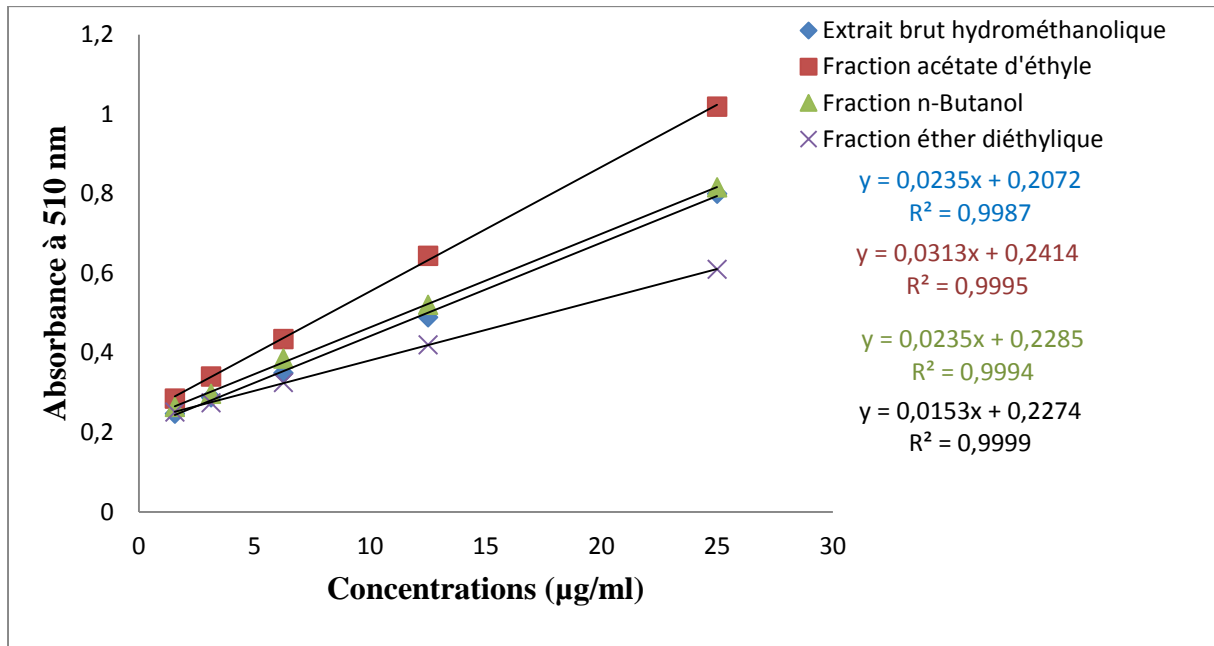


Figure 30: Test de l'activité antioxydante par la méthode de Phénanthroline de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*

Tableau 15. Les $A_{0,5}$ ($\mu\text{g/mL}$) des différents extraits de *M. pulegium* et de *S.chamaecyparissus*, obtenues par méthode de phénanthroline.

<i>M. pulegium</i>		<i>S. chamaecyparissus</i>	
EBM	11,88±0,14 ^a	EBS	12,45±0,07 ^a
FED-M	12,70±0,38 ^c	FED-S	17,77±0,13 ^b
FAE-M	8,70±0,09 ^b	FAE-S	8,26±0,12 ^c
FnB-M	11,55±0,07 ^c	FnB-S	11,53±0,03 ^d
BHT	0,93±0,07 ^d	BHT	0,93±0,07 ^e
BHA	2,24±0,17 ^d	BHA	2,24±0,17 ^e

M. pulegium : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique. *S. chamaecyparissus* : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique. (\pm) : Moyenne Erreur Standard (MES) (n=3). ^{a-e}Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à $p < 0,05$, comme déterminé par les tests à comparaisons multiples de Tukey et Student-Newman-Keul.

Nous avons constaté que l'absorbance augmente avec l'augmentation de la concentration de l'ensemble des extraits de *M.pulegium* et *S.chamaecyparissus*. D'après les résultats représentés dans le **tableau 15**, le pouvoir réducteur le plus important a été enregistré avec la fraction FAE-M de *M. pulegium* ($A_{0,5}=8,70\pm 0,09$) et la fraction FAE-S de *S.chamaecyparissus* ($A_{0,5} = 8,26 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$). Ce pouvoir réducteur est inférieur à celui du BHA et BHT.

Nous avons tracé une courbe de corrélation linéaire entre les valeurs de $A_{0,5}$ et les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits et fractions de *M. pulegium* (figure 31) et *S. chamaecyparissus* (figure 32).

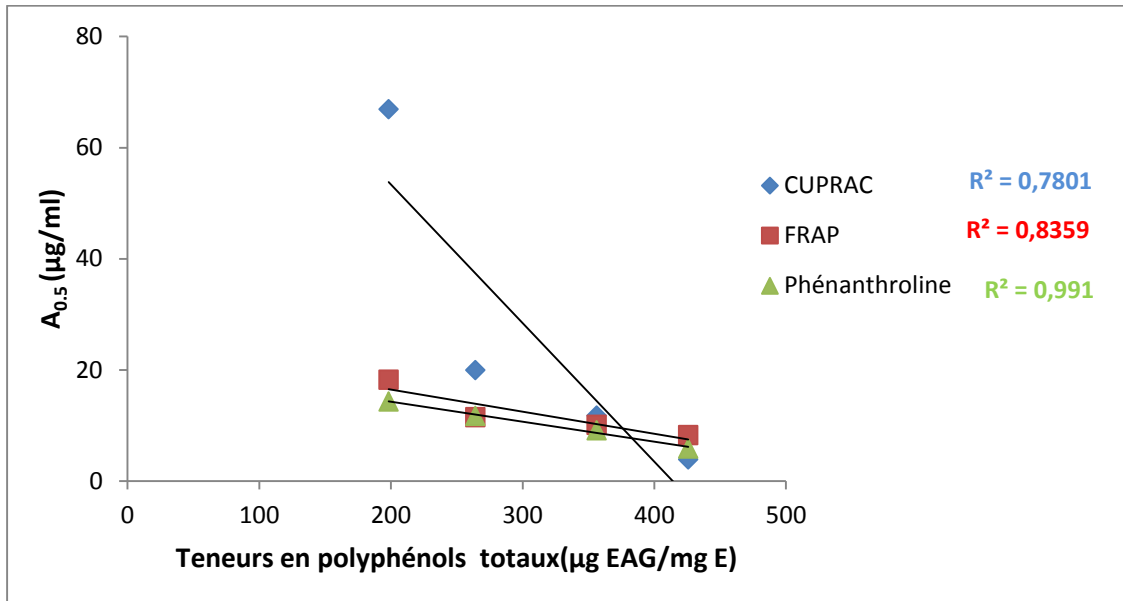


Figure 31: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les $A_{0,5}$ des différents tests antioxydants des différentes fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*

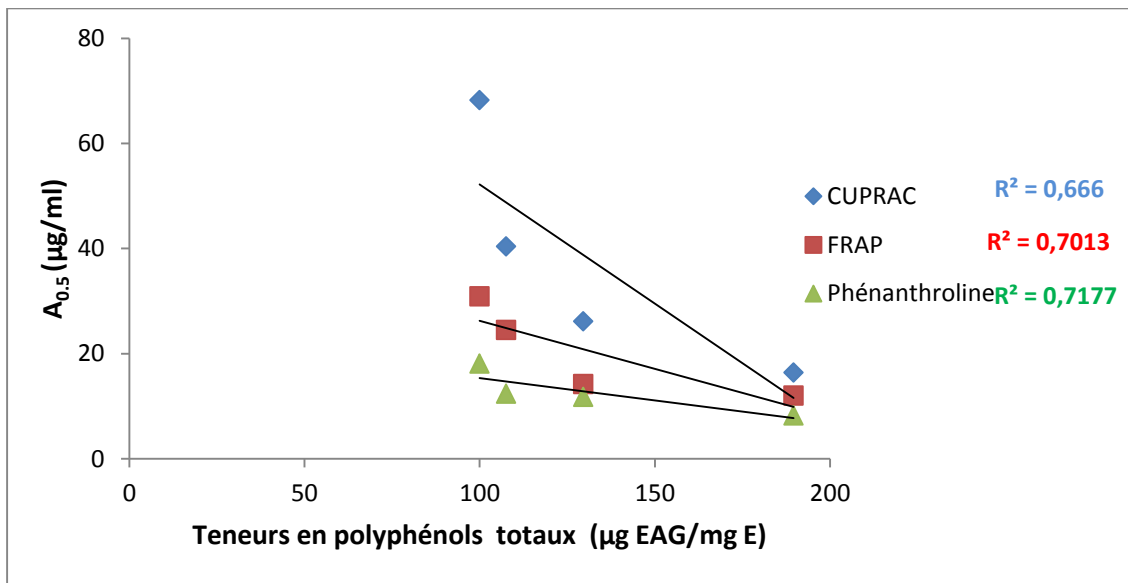


Figure 32: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les $A_{0,5}$ des différents tests antioxydants des différentes fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*.

Une forte corrélation (R^2 entre 0,701 et 0,991) a été constaté entre les teneurs en polyphénols totaux et le pouvoir réducteur des différents extraits et fractions de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus*.

2.9. Inhibition de blanchissement du β -carotène

La capacité des extraits de *M.pulegium* et *S.chamaecyparissus* à inhiber la peroxydation lipidique a été étudiée en suivant l'inhibition de blanchissement du β -carotène. Les résultats représentés dans les figures 33 et 34 ont montré que les pourcentages d'inhibition de blanchissement du β -carotène, sont proportionnels aux concentrations des extraits testés. Ces résultats nous ont permis de tracer des courbes de régressions logarithmiques. A partir de ces courbes nous avons calculé les CI_{50} (tableau 16).

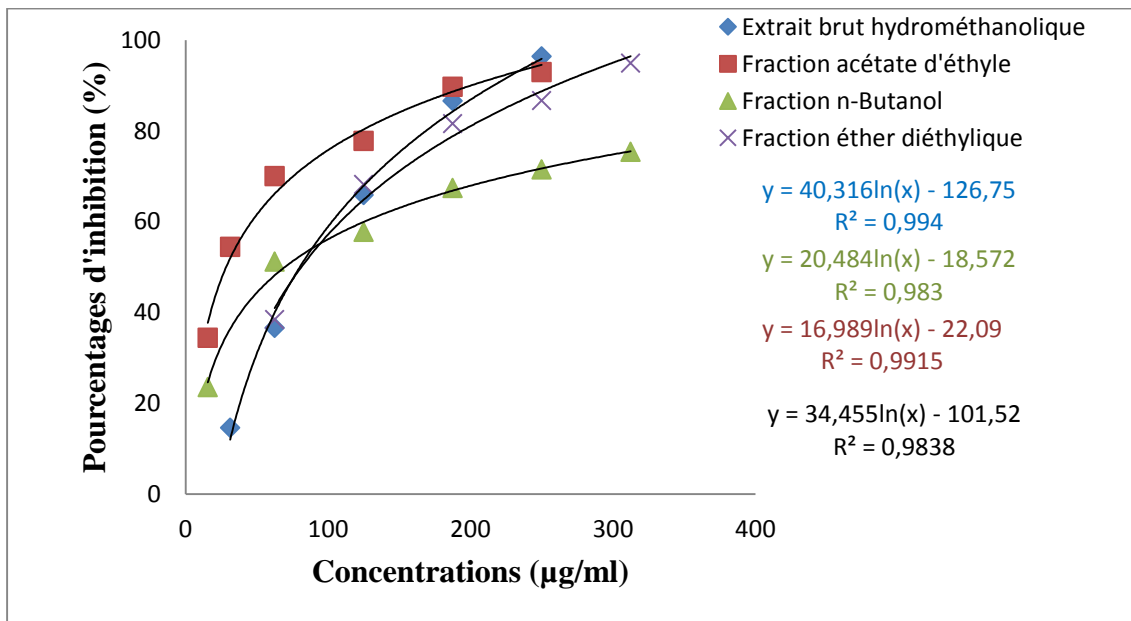


Figure 33: Pourcentages d'inhibition de blanchissement du β -carotène en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*.

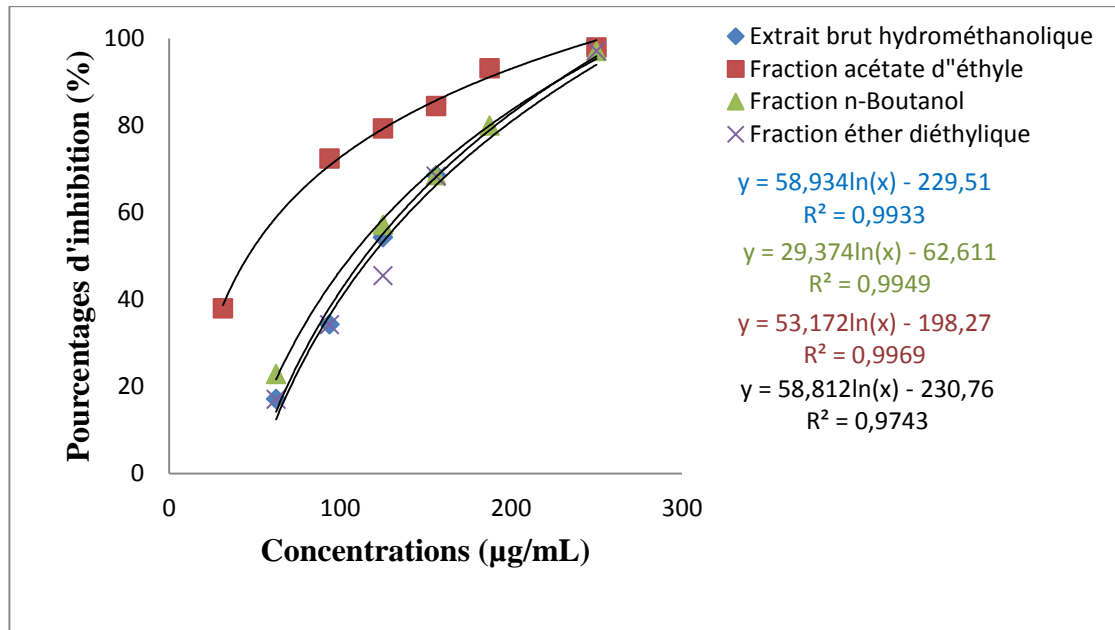


Figure 34: Pourcentages d'inhibition de blanchissement du β-carotène en fonction des concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*.

Tableau 16 : Les CI₅₀ (µg/mL) des différents extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* par méthode de blanchissement du β-carotène.

<i>M. pulegium</i>		<i>S. chamaecyparissus</i>	
EBM	80,22 ± 0,99 ^a	EBS	114,37±0,73 ^a
FED-M	81,35 ± 2,39 ^a	FED-S	118,48±0,3 ^b
FAE-M	28,40 ± 0,57 ^b	FAE-S	46,25±0,69 ^c
FnB-M	69,63 ± 2,41 ^c	FnB-S	106,63±1,15 ^d
BHT	1,24±0,00 ^d	BHT	1,24±0,00 ^e
BHA	1,26±0,00 ^d	BHA	1,26±0,00 ^e

M. pulegium : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique. *S. chamaecyparissus* : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique. (±) : Moyenne Erreur Standard (MES) (n=3). ^{a-d} Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à p < 0,05, comme déterminé par les tests à plages multiples de Tukey et Student-Newman-Keul.

Les résultats représentés dans le **tableau 16**, montrent que les valeurs de CI₅₀ des extraits de *M. pulegium* varient de 28,4 ± 0,57 à 81,35 ± 2,39 µg/ml et varient de 46,25 ± 0,69 à 118,48 ± 0,3 µg/ml pour *S. chamaecyparissus*. Les fractions acétate d'éthyle et n-butanol sont les plus puissants avec des valeurs de CI₅₀ respectives de l'ordre de 28,40 ± 0,57 et 69,63 ± 2,41 µg/ml pour *M. pulegium* et de 46,25 ± 0,69 µg/ml et 106,63 ± 1,15 µg/ml pour *S. chamaecyparissus*.

Ce potentiel d'inhibition de blanchissement du β -carotène reste inférieur à celui des antioxydants de synthèse, le BHA ($CI_{50}=1,26 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$) et le BHT ($CI_{50} = 1,24 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$).

3. Activité anti-hémolytique

L'activité anti-hémolytique des extraits de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* a été évaluée. Ce test consiste à soumettre les globules rouges à une agression radicalaire par l'AAPH dans le but de démontrer l'effet protecteur des extraits sur la prévention de l'intégrité des érythrocytes afin de résister à cette agression, jusqu'à ce que la membrane cellulaire soit modifiée au point de libérer leurs contenus cellulaires.

La cinétique d'hémolyse obtenue pour les extraits bruts hydrométhanoliques de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* et de leurs fractions obtenues ont montré que l'inhibition de l'hémolyse a été remarquée pour tous les différents extraits d'une manière dose-dépendante.

À partir des cinétiques d'hémolyses obtenues, nous avons calculé les valeurs d' HT_{50} (le temps de demi-hémolyse) des extraits des plantes étudiées et de l'acide ascorbique à différentes concentrations. Les résultats d' HT_{50} sont représentés dans les tableaux 17 et 18.

Tableau 17. Temps de demi-hémolyse (HT_{50} min) pour les extraits de *M. pulegium*

Extrait/fractions	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)			
	10	20	40	80
EBM	160,86 \pm 0,23	163,15 \pm 0,61	164,03 \pm 5,87	168,4 \pm 1,02
FED-M	175,9 \pm 0,47	190,53 \pm 0,29	214,3 \pm 0,35	217,3 \pm 2,53
FAE-M	209,0 \pm 1,3	212,03 \pm 0,49	214,75 \pm 1,51	236,35 \pm 2,98
FnB-M	176,05 \pm 0,69	202,1 \pm 1,63	207,26 \pm 4,87	217,5 \pm 0,75
Acide ascorbique	162,9 \pm 2,25	186,1 \pm 2,40	203,23 \pm 0,28	209,1 \pm 0,58

M. pulegium : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique. (\pm) : Moyenne Erreur Standard (MES) (n=3).

Tableau 18. Temps de demi-hémolyse (HT₅₀ min) pour les extraits de *S. chamaecyparissus*

Extrait/fractions	Concentration (µg/ml)			
	10	20	40	80
EBS	161,75±0,53	167,86±0,49	193,06±0,08	207,7±0,46
FED-S	163,93±0,66	170,53±0,08	209,06±0,21	217,1±0,41
FAE-S	199,73±3,22	215,5±4,491	229,8±1,47	239,3±3,75
FnB-S	172,7±0,163	198,25±1,34	206,7±1,06	218,1±0,57
Acide ascorbique	162,9±2,25	186,1±2,40	203,23±0,28	209,1±0,58

S. chamaecyparissus : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique. (±) : Moyenne Erreur Standard (MES) (n=3).

Nous avons remarqué que les doses (10µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml, 80µg/ml) de l'extrait brut hydrométhanolique des deux plantes étudiées et ses fractions obtenues ont provoqué un retardement d'hémolyse remarquable par rapport au témoin (152,27 ± 2,75 min). Les fractions acétate d'éthyle, n-butanol et éther diéthylique de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* ont enregistré une capacité anti-hémolytique meilleure à celui de l'acide ascorbique. Tandis que l'extrait brut hydrométhanolique des deux plantes a présenté l'effet protecteur le plus faible.

4. Activité antidiabétique

L'activité antidiabétique des extraits bruts hydrométhanoliques de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* et leurs fractions a été réalisée en évaluant le potentiel des extraits à inhiber les deux enzymes digestives, l'α-amylase et l'α-glucosidase.

4.1. Activité inhibitrice de l'α-amylase

Les figures 35 et 36 ont montré une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition de l'α-amylase en fonction des différentes concentrations des extraits de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus*. Les CI₅₀ ont été déterminés à partir des équations de régressions logarithmiques de courbes illustrées (**Figure 37**).

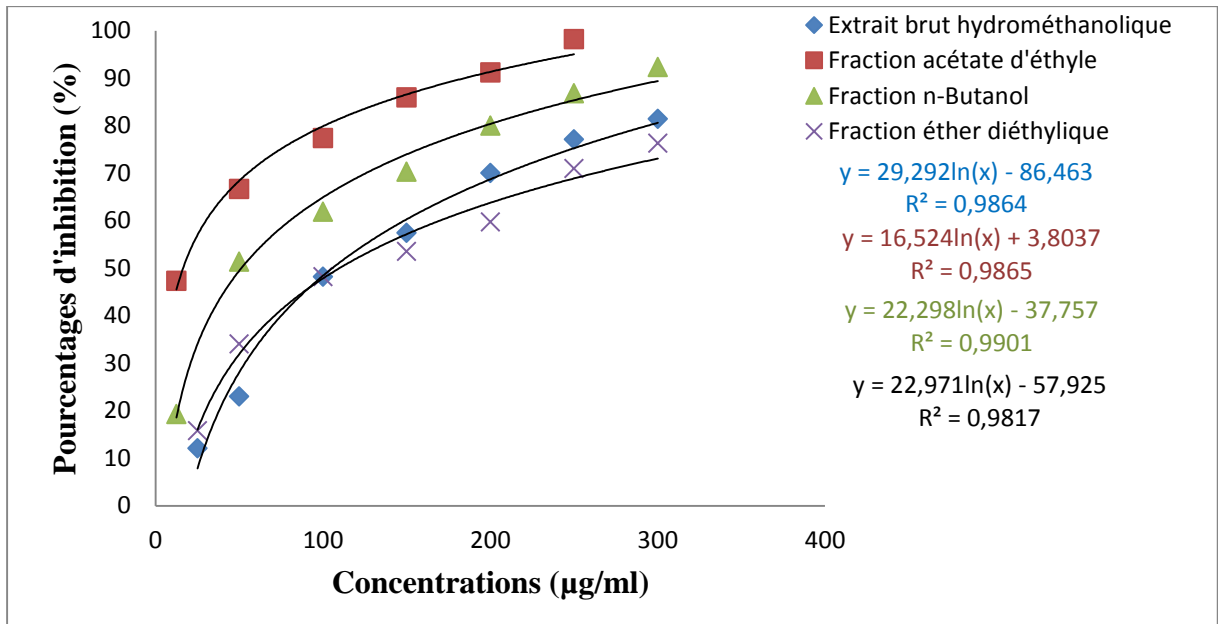


Figure 35: Pourcentages d'inhibition de l'α-amylase en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*.

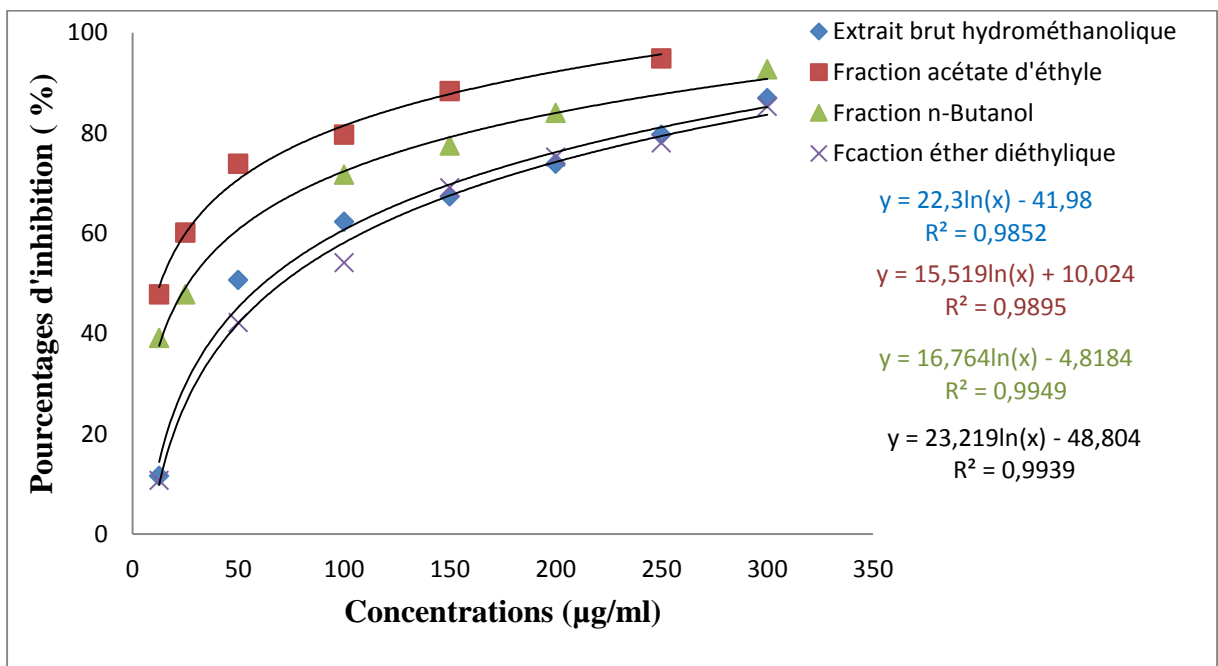


Figure 36: Pourcentages d'inhibition de l'α-amylase en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*.

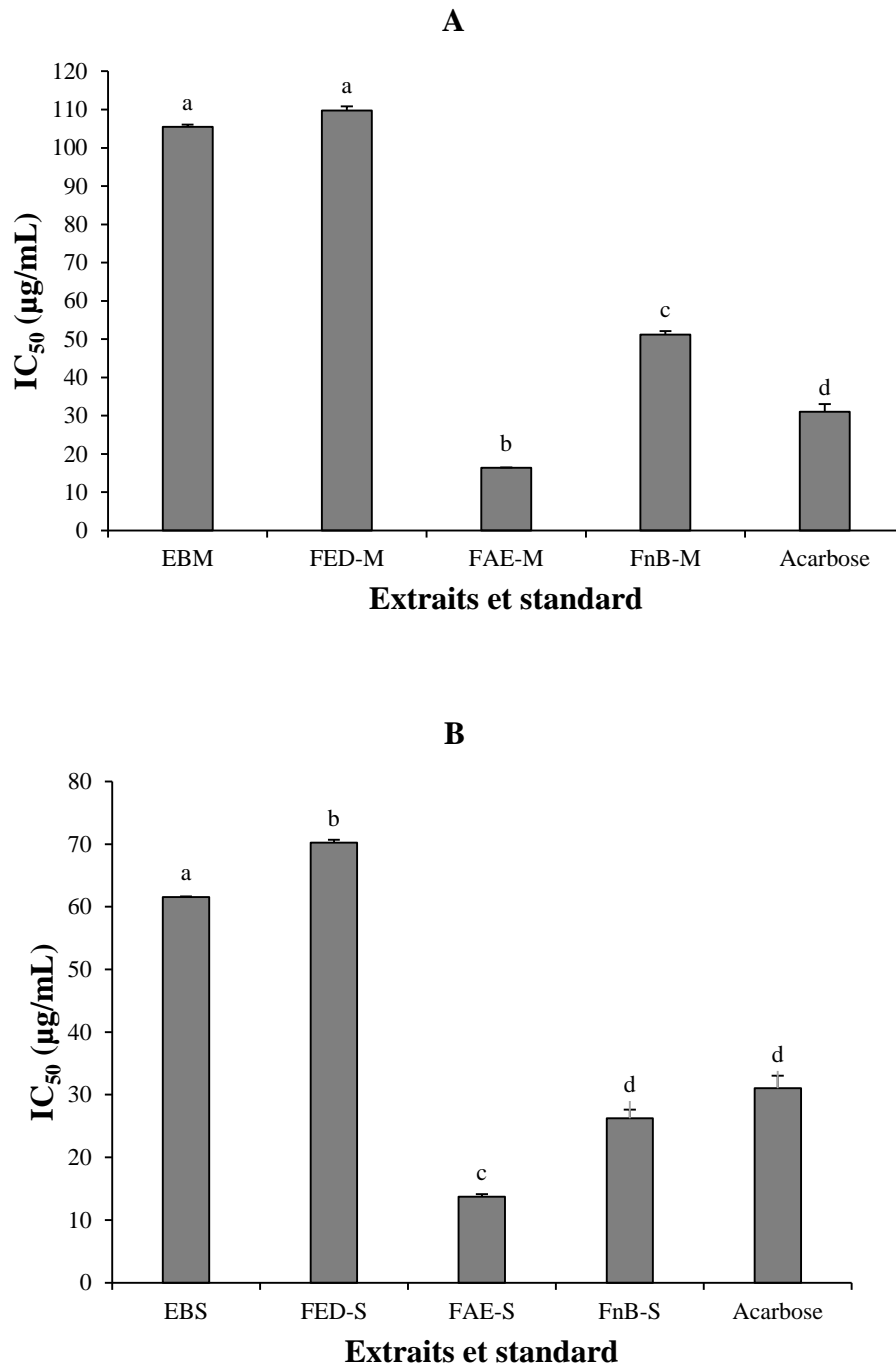


Figure 37: Valeurs des CI₅₀ de l'inhibition de l' α - amylase de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *M.pulegium* (A) et *S.chamaecyparissus* (B) et ses fractions obtenues en comparaison avec la valeur CI₅₀ de l'Acarbose

^{a-d} Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à $p < 0,05$, comme déterminé par les tests à comparaisons multiples de Tukey et Student-Newman-Keul. EBM : Extrait brut hydrométhanolique de *M.pulegium*; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle de *M.pulegium*; FnB-M : Fraction n-butanol de *M.pulegium*; FED-M : Fraction d'éther diéthylique de *M.pulegium*; EBS : Extrait brut hydrométhanolique de *S.chamaecyparissus*; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle de *S.chamaecyparissus*; FnB-S : Fraction n-butanol de *S.chamaecyparissus*; FED-S : Fraction d'éther diéthylique de *S.chamaecyparissus*.

Les résultats obtenus ont indiqué que tous les extraits des deux plantes étudiées possédaient une activité inhibitrice importante vis-à-vis de l' α -amylase et que la fraction d'acétate d'éthyle de *M. pulegium* (FAE-M) a montré la plus forte activité inhibitrice ($CI_{50}=16,37 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$). Cette activité inhibitrice est meilleure que celle de l'Acarbose (antidiabétique commercial) ($CI_{50} = 31,03 \pm 1,98 \mu\text{g/ml}$). Pour *S.chamaecyparissus*, les fractions FAE-S ($13,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$) et FnB-S ($26,26 \pm 1,37 \mu\text{g/ml}$) ont également enregistré une activité inhibitrice meilleure à celle de l'Acarbose. Cependant, la fraction éther diéthylique de *M. pulegium* et de *S.chamaecyparissus* a présenté le pouvoir inhibiteur le plus faible avec des CI_{50} de l'ordre de $109,73 \pm 1,14 \mu\text{g/ml}$ et de $70,25 \pm 0,44 \mu\text{g/ml}$, respectivement.

4.2. Activité inhibitrice de l' α -glucosidase

Les pourcentages d'inhibition de l' α -glucosidase en fonction des concentrations des extraits de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S.chamaecyparissus* (Figures 38 et 39) ainsi que les valeurs des CI_{50} calculées ont été représentées dans la figure 40.

L'ensemble des extraits de *M.pulegium* et de *S. chamaecyparissus* ont montré un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l' α -glucosidase et ceci d'une manière dose-dépendante.

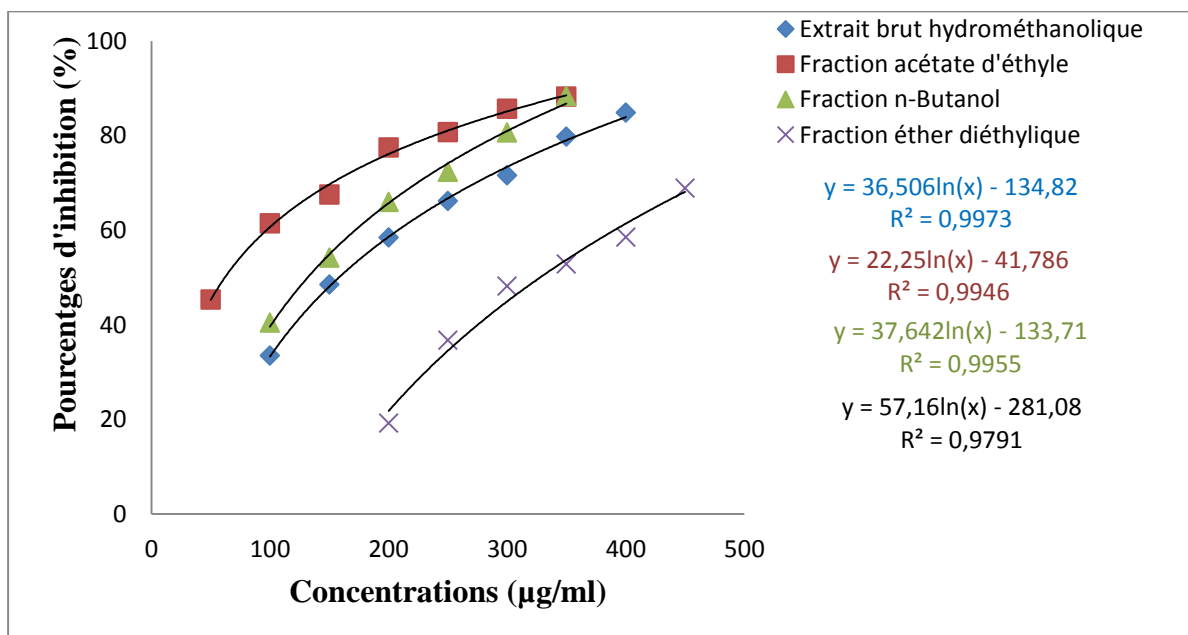


Figure 38: Pourcentages d'inhibition de l' α -glucosidase en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*.

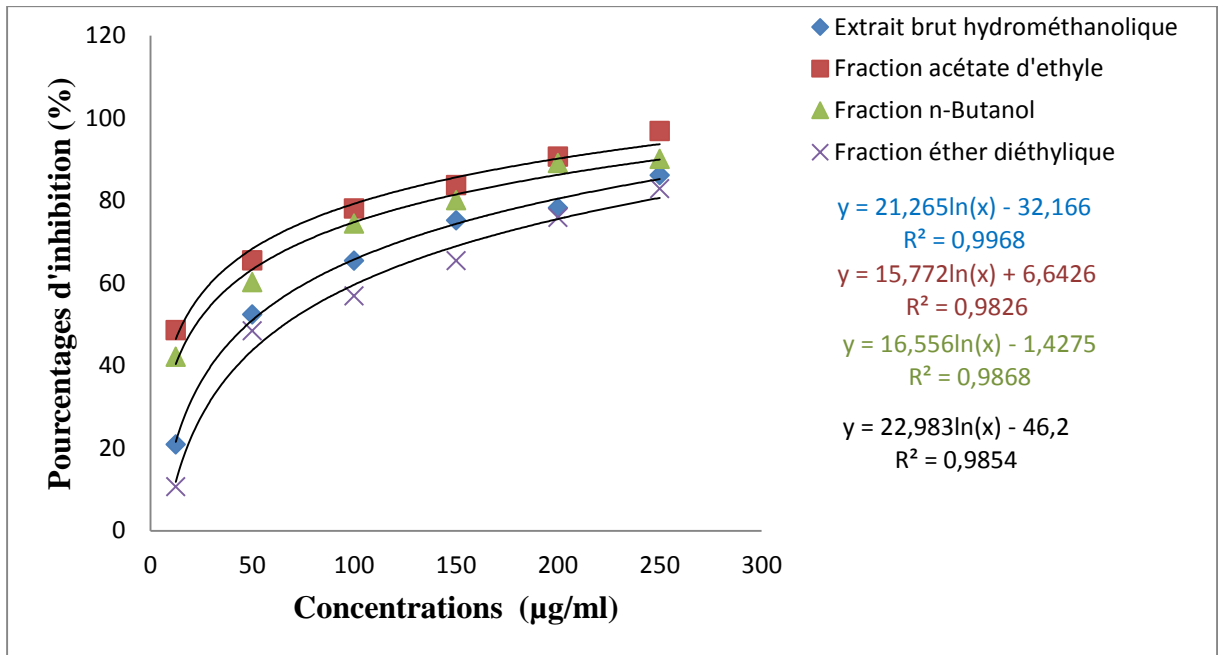
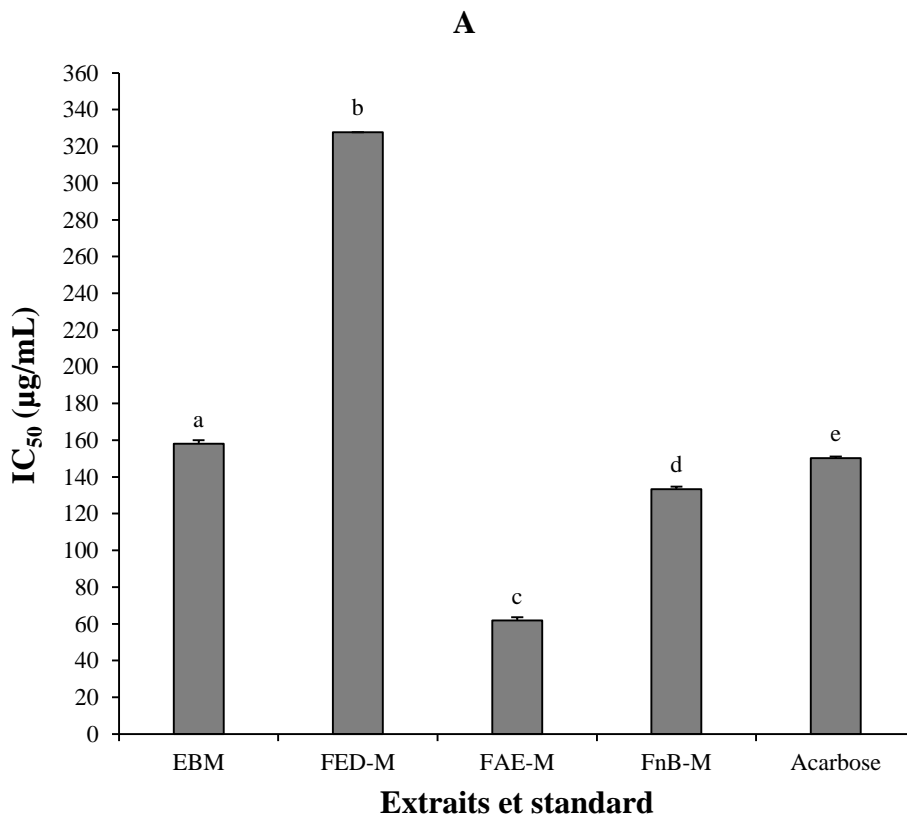


Figure 39: Pourcentages d'inhibition de l'α-glucosidase en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération et ses fractions de la partie aérienne de *S.chamaecyparissus*.



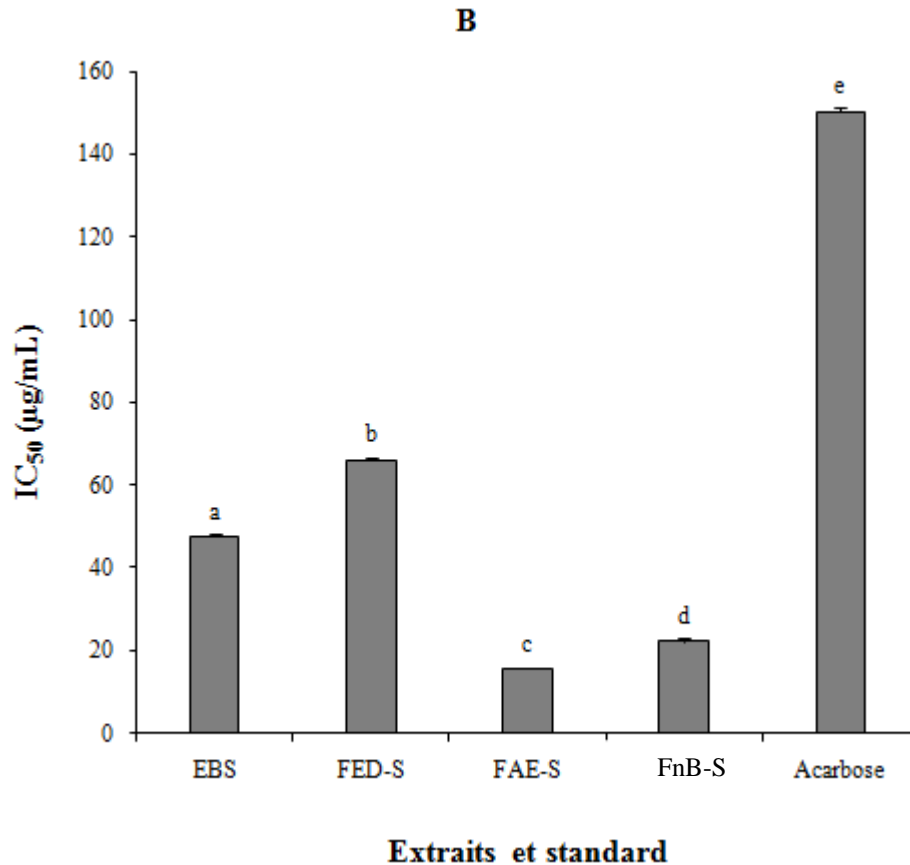


Figure 40: Valeurs des CI₅₀ de l'inhibition de l' α -glucosidase de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *M.pulegium* (A) et de *S.chamaecyparissus* (B) et ses fractions obtenues en comparaison avec la valeur CI₅₀ de l'Acarbose

^{a-e} Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à $p < 0,05$, comme déterminé par les tests à comparaisons multiples de Tukey et Student-Newman-Keul. EBM : Extrait brut hydrométhanolique de *M.pulegium*; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle de *M.pulegium*; FnB-M : Fraction n-butanol de *M.pulegium*; FED-M : Fraction d'éther diéthylique de *M.pulegium*; EBS : Extrait brut hydrométhanolique de *S.chamaecyparissus*; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle de *S.chamaecyparissus*; FnB-S : Fraction n-butanol de *S.chamaecyparissus*; FED-S : Fraction d'éther diéthylique de *S.chamaecyparissus*.

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que les fractions acétate d'éthyle (FAE-M) (CI₅₀ = 61,85 ± 1,69 µg/ml) et n-butanol (FnB-M) (CI₅₀ = 133,25 ± 1,54 µg/ml) de *M. pulegium* ont enregistré une activité inhibitrice meilleure à celle de l'Acarbose (CI₅₀ = 150,26 ± 0,88 µg/ml). De même, nous avons noté une forte activité inhibitrice de l'alpha-glucosidase en présence d'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* (EBS) et ses fractions FED-S, FAE-S et FnB-S avec des CI₅₀ respectives de l'ordre de 47,64 ± 0,40 µg/ml, 66,08 ± 0,68 µg/ml, 15,62 ± 0,16 µg/ml et 22,33 ± 0,68 µg/ml. Cette activité est significativement supérieure à celle de l'Acarbose.

Les résultats de corrélation entre l'activité inhibitrice de l' α -amylase et de l' α -glucosidase et les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits et fractions de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* sont représentés dans les figures 41 et 42.

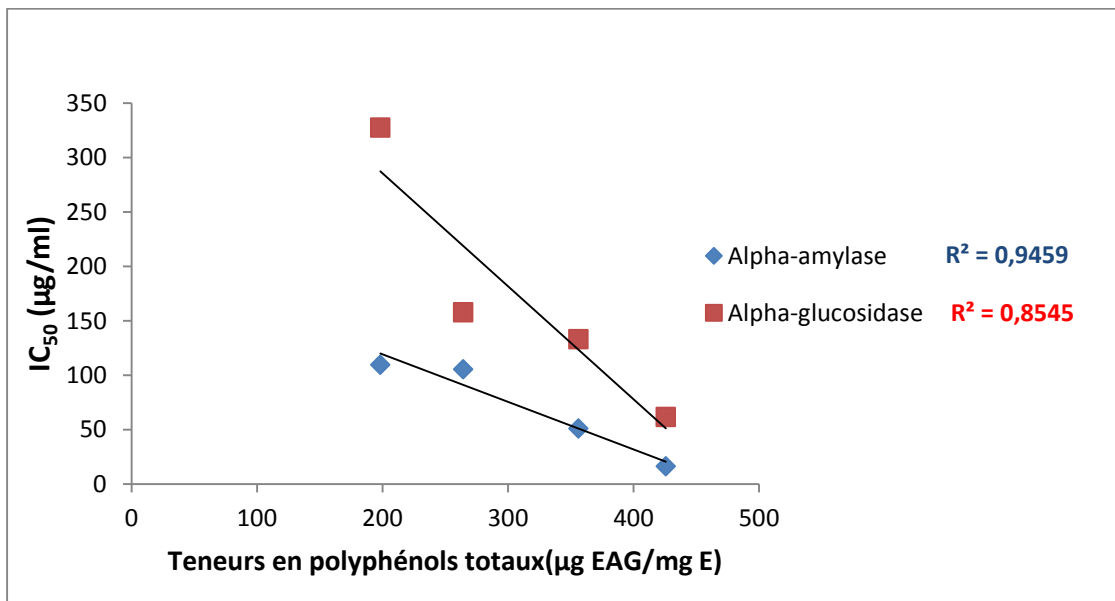


Figure 41: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI₅₀ des différents tests d'activité inhibitrice de l' α -amylase et de l' α -glucosidase des différents extraits et fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*.

Une corrélation fortement significative a été distinguée entre les teneurs en polyphénols totaux et l'activité inhibitrice de l' α -amylase ($R^2 = 0,945$) et l' α -glucosidase ($R^2 = 0,854$) des différents extraits et fractions de *M. pulegium*.

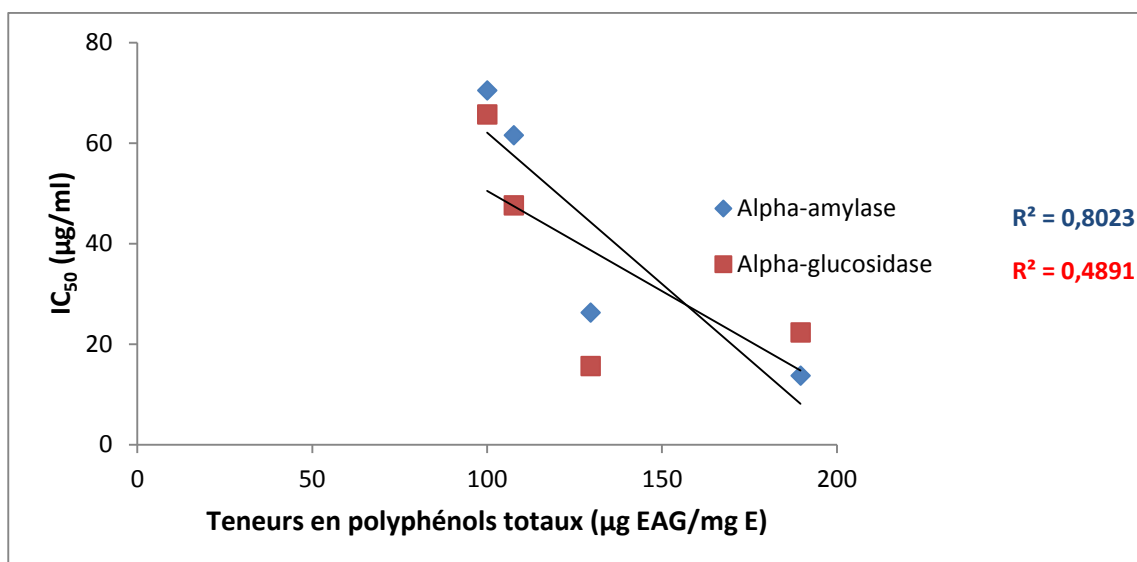


Figure 42: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI₅₀ des différents tests d'activité inhibitrice de l'alpha-amylase et de l'alpha-glucosidase des différentes fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*.

Une forte corrélation a été constatée entre les teneurs en polyphénols totaux et l'activité inhibitrice de l' α -amylase ($R^2 = 0,802$) des différents extraits et fractions de *S. chamaecyparissus*. Cependant, une faible corrélation a été établie entre les teneurs en polyphénols totaux et l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase ($R^2 = 0,489$).

4.3. Activité antiglycation

L'effet antiglycant du BSA par l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* et ses fractions obtenues a été étudié *in vitro* en évaluant leurs effets inhibiteurs sur la formation des AGE. Les résultats représentés **dans les figures 43 et 44**, ont montré que les pourcentages d'inhibition de glycation, sont proportionnels aux concentrations des extraits testés. Les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes logarithmiques et à partir de ces courbes nous avons calculé les CI_{50} (Tableau 19). Nous avons remarqué que l'ensemble des extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* ont montré un pouvoir inhibiteur important.

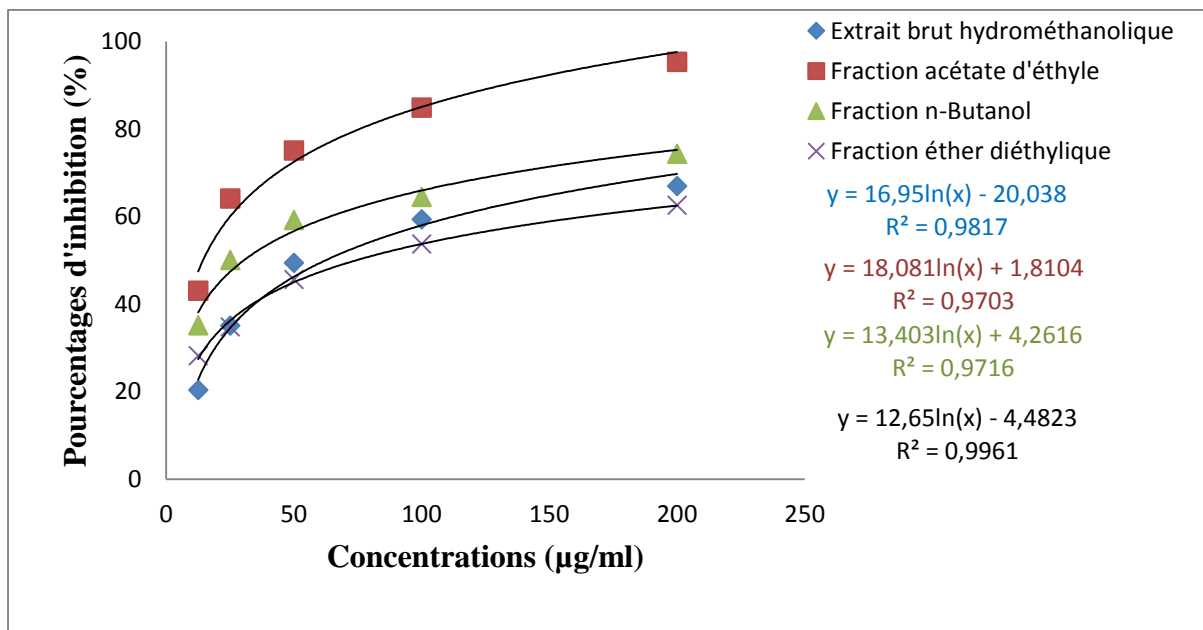


Figure 43: Pourcentages d'inhibition de glycation en fonction de différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération, et ses fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*

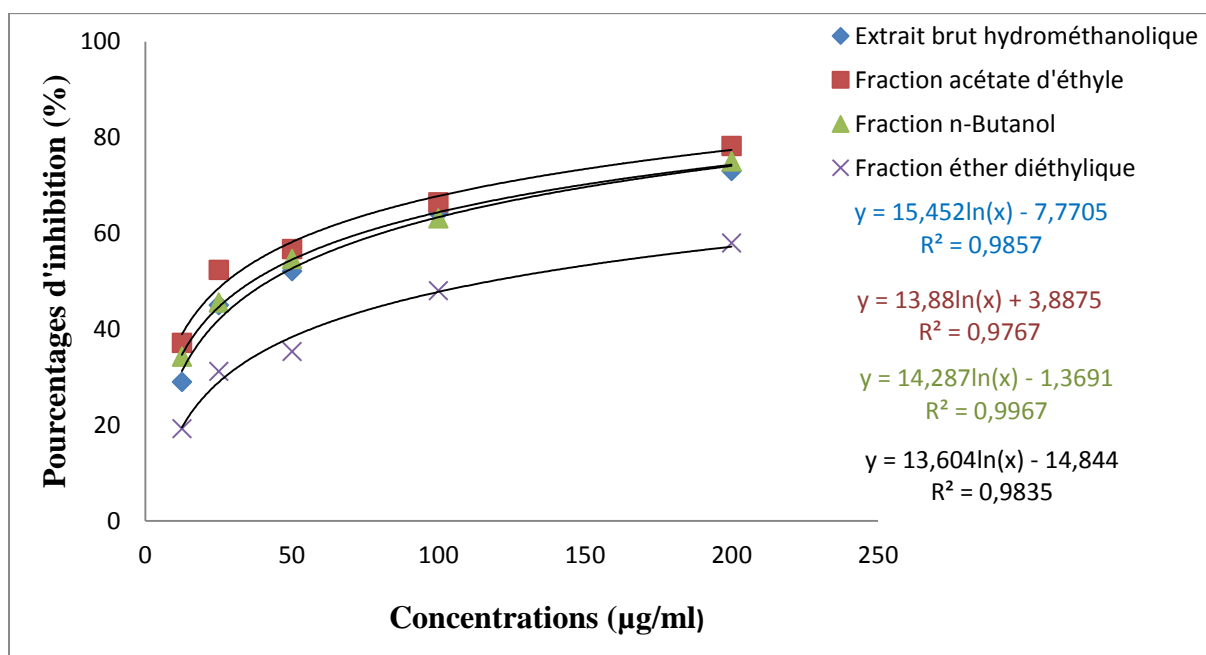


Figure 44: Pourcentages d'inhibition de glycation en fonction de concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération, et ses fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*.

Tableau 19. Les CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) des différents extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus*

<i>M. pulegium</i>		<i>S. chamaecyparissus</i>	
EBM	62,31±0,75 ^a	EBS	42,02±0,17 ^a
FED-M	74,21±0,37 ^d	FED-S	117,5±0,61 ^d
FAE-M	14,37±0,01 ^b	FAE-S	27,72±0,04 ^b
FnB-M	30,34±0,13 ^c	FnB-S	36,43±0,00 ^c
Rutine	30,42 ± 0,01 ^c	Rutine	30,42 ± 0,01 ^e

M. pulegium : EBM : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-M : Fraction n-butanol ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique. *S. chamaecyparissus* : EBS : Extrait brut hydrométhanolique ; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle ; FnB-S : Fraction n-butanol ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique. Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à $p < 0,05$, comme déterminé par les tests à plages multiples de Tukey et Student-Newman-Keul. (\pm) : Moyenne Erreur Standard (MES) (n=3).

Les résultats obtenus pour *M. pulegium* ont montré que la FAE-M ($CI_{50}=14,37 \pm 0,01\mu\text{g/ml}$) a présenté le pouvoir inhibiteur le plus puissant qui est significativement supérieur à celui de la rutine ($CI_{50} = 30,42 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$) tandis que la FnB-M ($CI_{50} = 30,34 \pm 0,13 \mu\text{g/ml}$) a enregistré un potentiel inhibiteur significativement similaire à celui de la rutine.

Alors que pour *S. chamaecyparissus*, l'activité inhibitrice la plus forte a été enregistrée pour FAE-S ($CI_{50} = 27,72 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$). Cette activité a été significativement supérieure à celle de la rutine.

Par contre, les fractions éther diéthylique de *M. pulegium* (FED-M) et de *S. chamaecyparissus* (FED-S) ont présenté le pouvoir inhibiteur le plus faible avec des CI_{50} respectives de l'ordre de $74,21 \pm 0,37 \mu\text{g/ml}$ et de $117,5 \pm 0,61 \mu\text{g/ml}$.

Les résultats de corrélation entre l'activité antiglycation et les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits et fractions de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* sont représentés dans les figures 45 et 46.

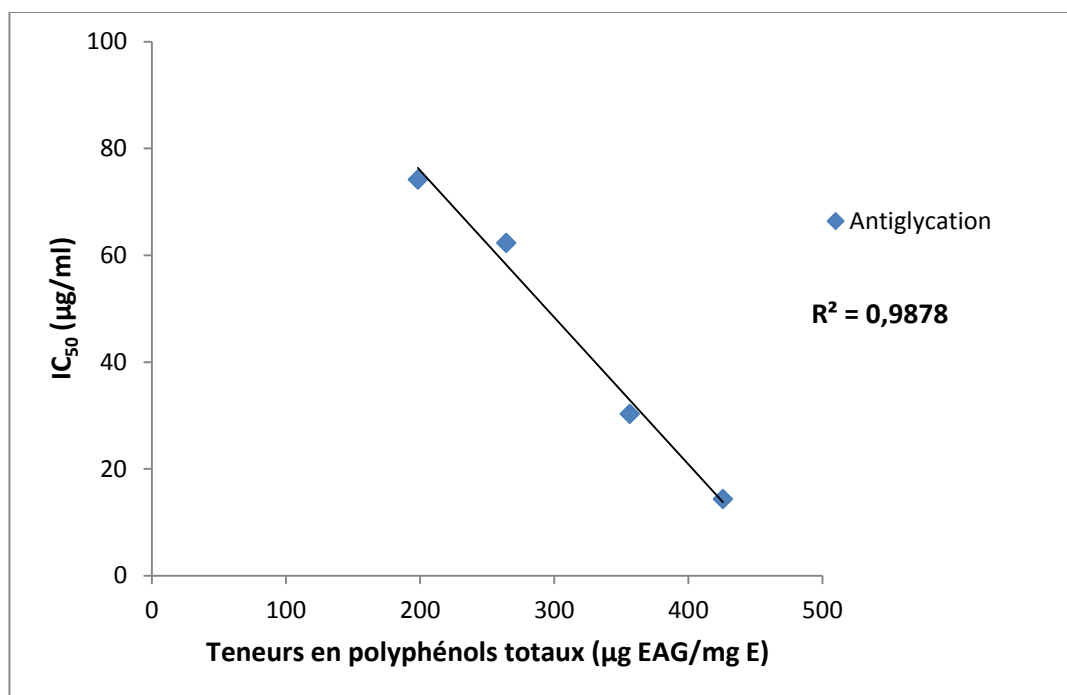


Figure 45: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI_{50} des différents tests d'activité antiglycation des différentes fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*

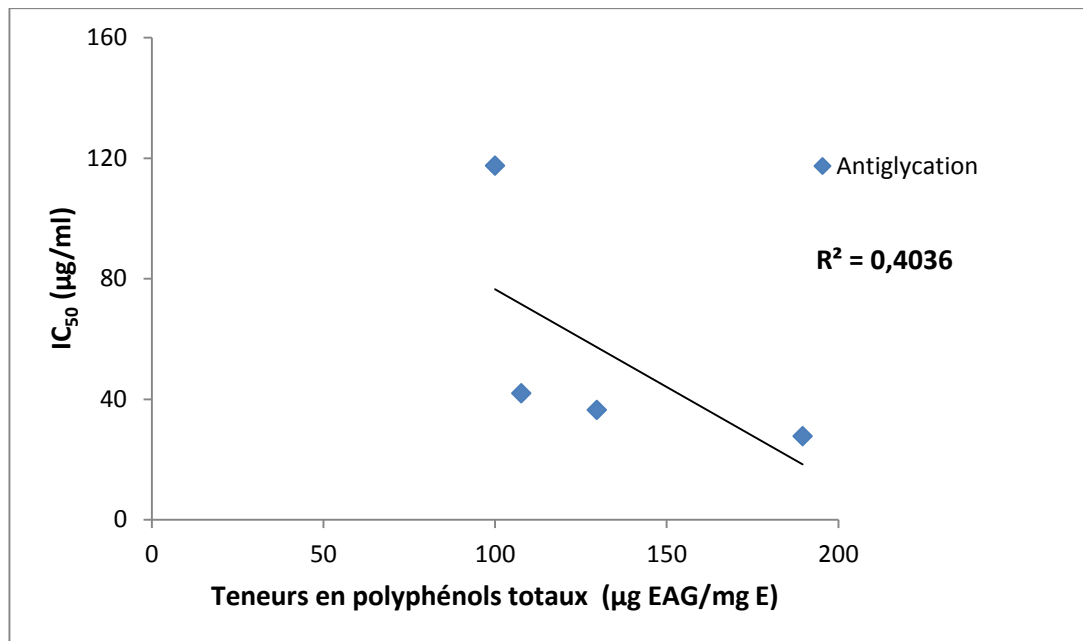


Figure 46: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les IC_{50} des différents tests d'activité antiglycation des différentes fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*.

Une forte corrélation ($R^2 = 0,987$) a été établie entre les teneurs en polyphénols totaux et l'activité antiglycation des différents extraits et fractions de *M. pulegium*. Cependant une faible corrélation ($R^2 = 0,403$) a été constaté entre les teneurs en polyphénols totaux et l'activité antiglycation des différents extraits et fractions de et *S. chamaecyparissus*.

5. Activité anti-Alzheimer

5.1. Activité inhibitrice vis-à-vis de l'acétylcholinestérase (AChE)

Les figures 47 et 48 montrent les pourcentages d'inhibition de l'AChE en fonction des différentes concentrations des extraits de *M. pulegium* et *S.chamaecyparissus*. Les IC_{50} sont représentés dans la figure 49.

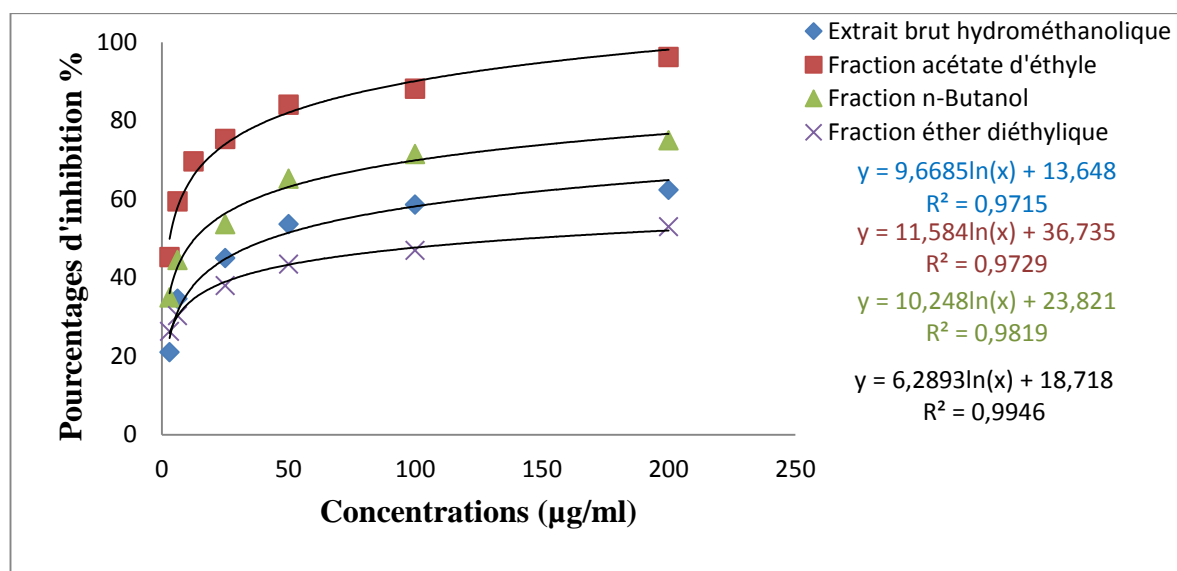


Figure 47: Pourcentages d'inhibition de l'AChE en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération, et ses fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*.

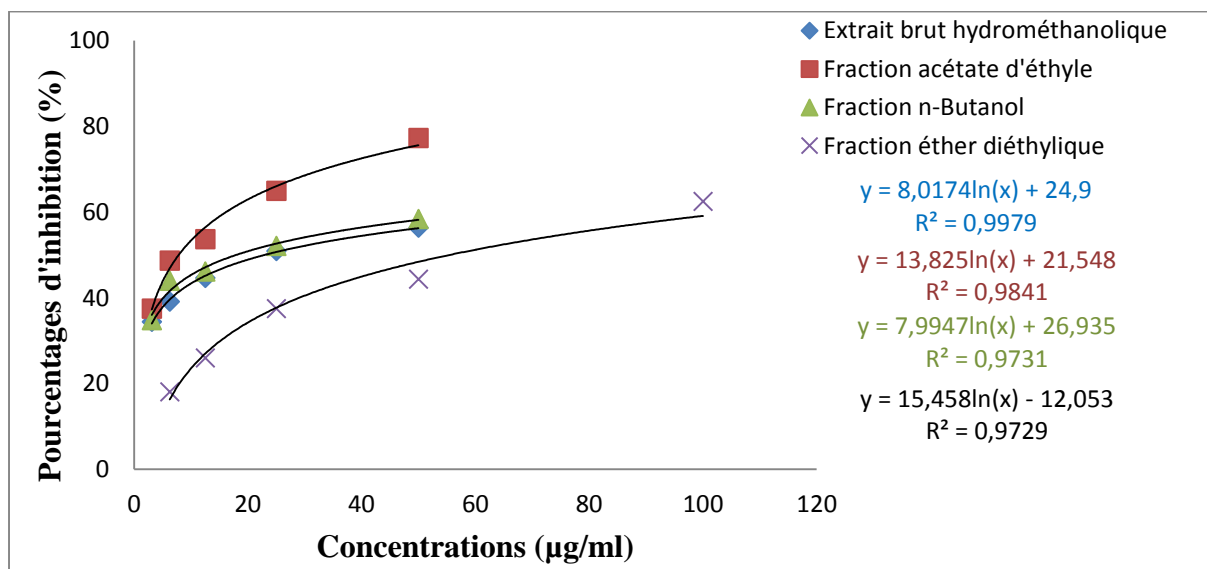
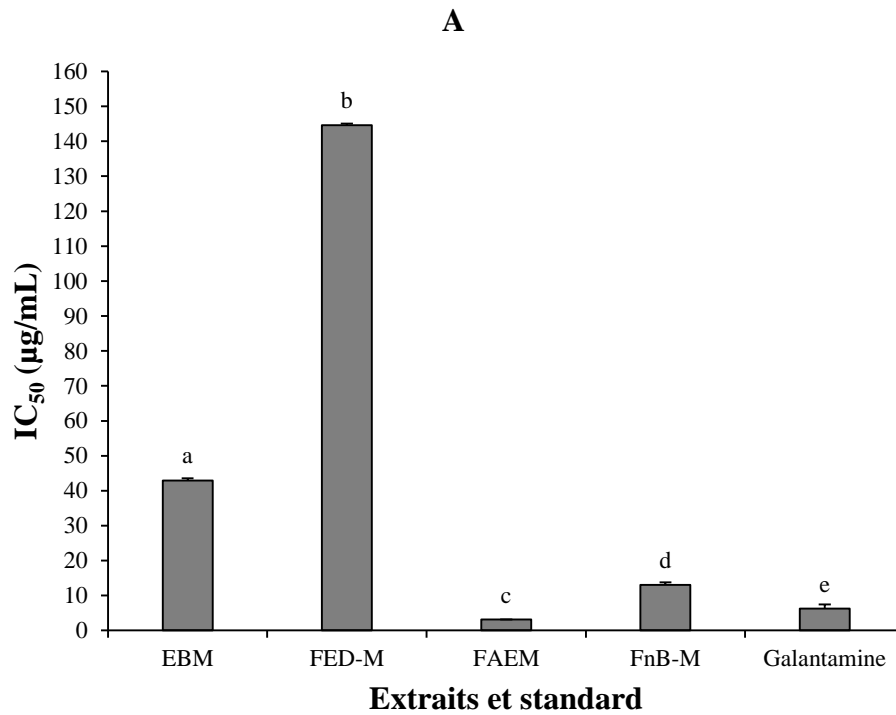


Figure 48: Pourcentages d'inhibition de l'AChE en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération, et ses fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*.

Nous avons remarqué que l'ensemble des extraits ont une activité inhibitrice vis-à-vis de l'AChE et ceci d'une manière dose-dépendante.

Pour *M. pulegium*, la fraction acétate d'éthyle (FAE-M) a montré l'inhibition la plus importante avec un pourcentage d'inhibition qui dépasse 80 % à une concentration de 50 µg/ml. L'ordre de l'activité inhibitrice des extraits vis-à-vis de l'AChE a été comme suit : Fraction éthère diéthylique < extrait brut hydromethanolique < fraction n-butanol < fraction acétate d'éthyle.

Cette dernière fraction (FAE-M) a révélé l'activité inhibitrice la plus forte vis-à-vis de l'AChE avec une CI_{50} de l'ordre de $3,13 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$, cette activité inhibitrice est meilleure que celle du standard Galantamine ($CI_{50}=6,27 \pm 1,15 \mu\text{g/ml}$). Pour *S.chamaecyparissus*, le même ordre a été suivi et la fraction acétate d'éthyle (FAE-S) est la plus active vis-à-vis de l'AChE avec une CI_{50} de l'ordre de $7,82 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$ (Figure 49).



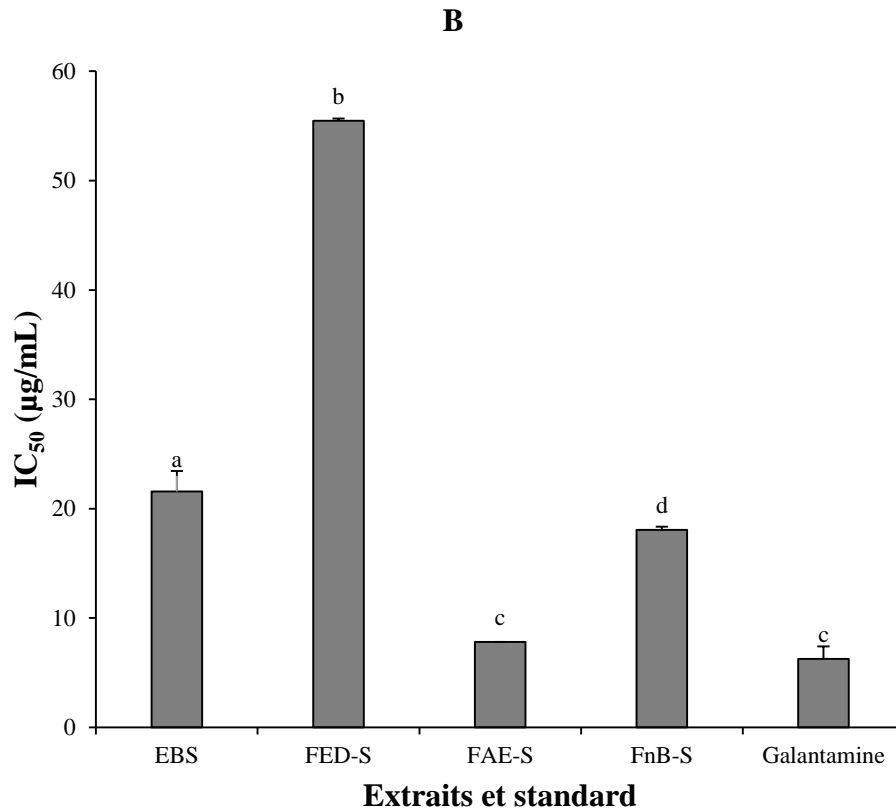


Figure 49: Valeurs des CI_{50} de l'inhibition de l'AChE de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *M.pulegium* (A) et de *S.chamaecyparissus* (B) et leurs fractions obtenues en comparaison avec la valeur CI_{50} de la Galantamine.

EBM : Extrait brut hydrométhanolique de *M.pulegium*; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle de *M.pulegium*; FnB-M : Fraction n-butanol de *M.pulegium* ; FED-M : Fraction d'éther diéthylique de *M.pulegium* ; EBS : Extrait brut hydrométhanolique de *S.chamaecyparissus*; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle de *S.chamaecyparissus*; FnB-S : Fraction n-butanol de *S.chamaecyparissus* ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique de *S.chamaecyparissus*. ^{a-d} Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à $p < 0,05$, comme déterminé par les tests à comparaisons multiples de Tukey et Student-Newman-Keul.

5.2. Activité inhibitrice vis-à-vis de la butyrylcholinestérase (BChE)

Les figures 50 et 51 ont montré une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition de la butyrylcholinestérase (BChE) en fonction des différentes concentrations des extraits de la partie aérienne de *M. pulegium* et de *S.chamaecyparissus*. Les CI_{50} ont été calculées à partir des équations de régressions logarithmiques des courbes illustrées (Figure 52).

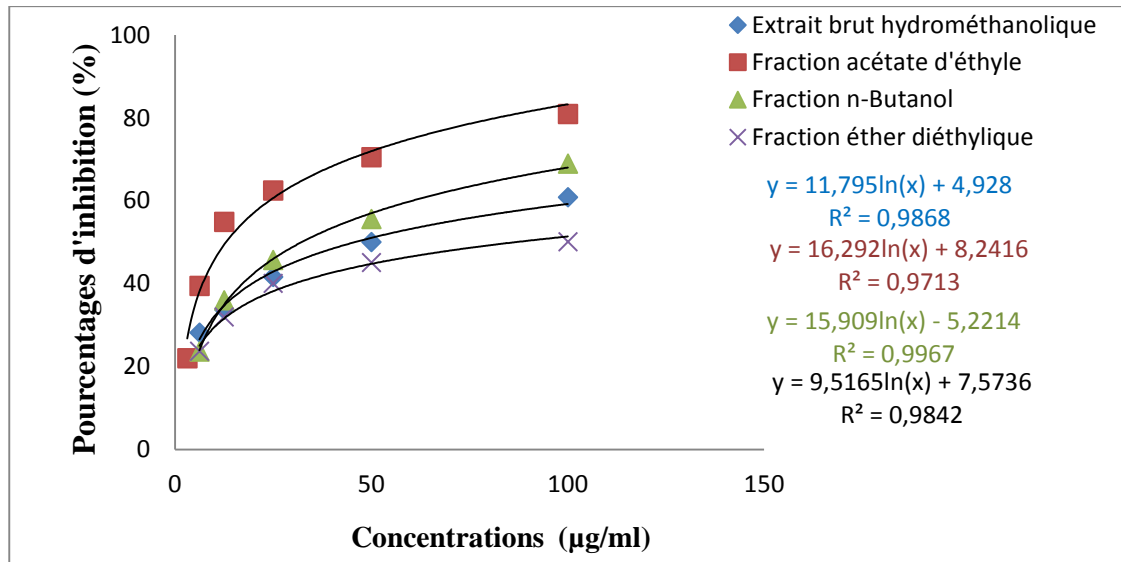


Figure 50: Pourcentages d'inhibition de l'BChE en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération, et ses fractions de la partie aérienne de *M.pulegium*

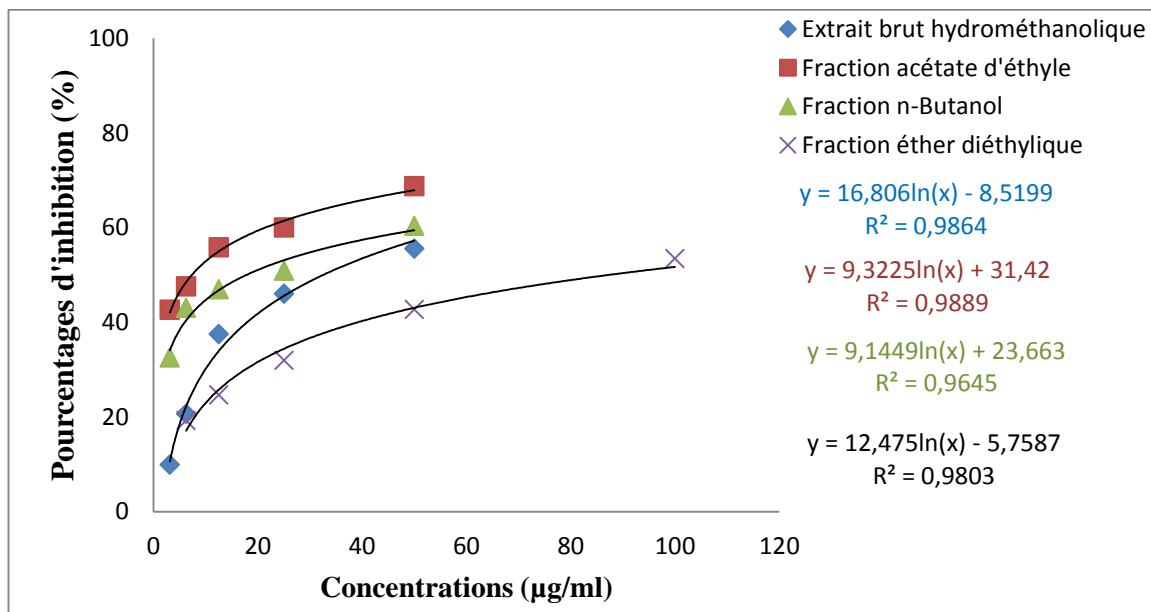


Figure 51: Pourcentages d'inhibition de l'BChE en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut hydrométhanolique, préparé par macération, et ses fractions de la partie aérienne de *S.chamaecyparissus*.

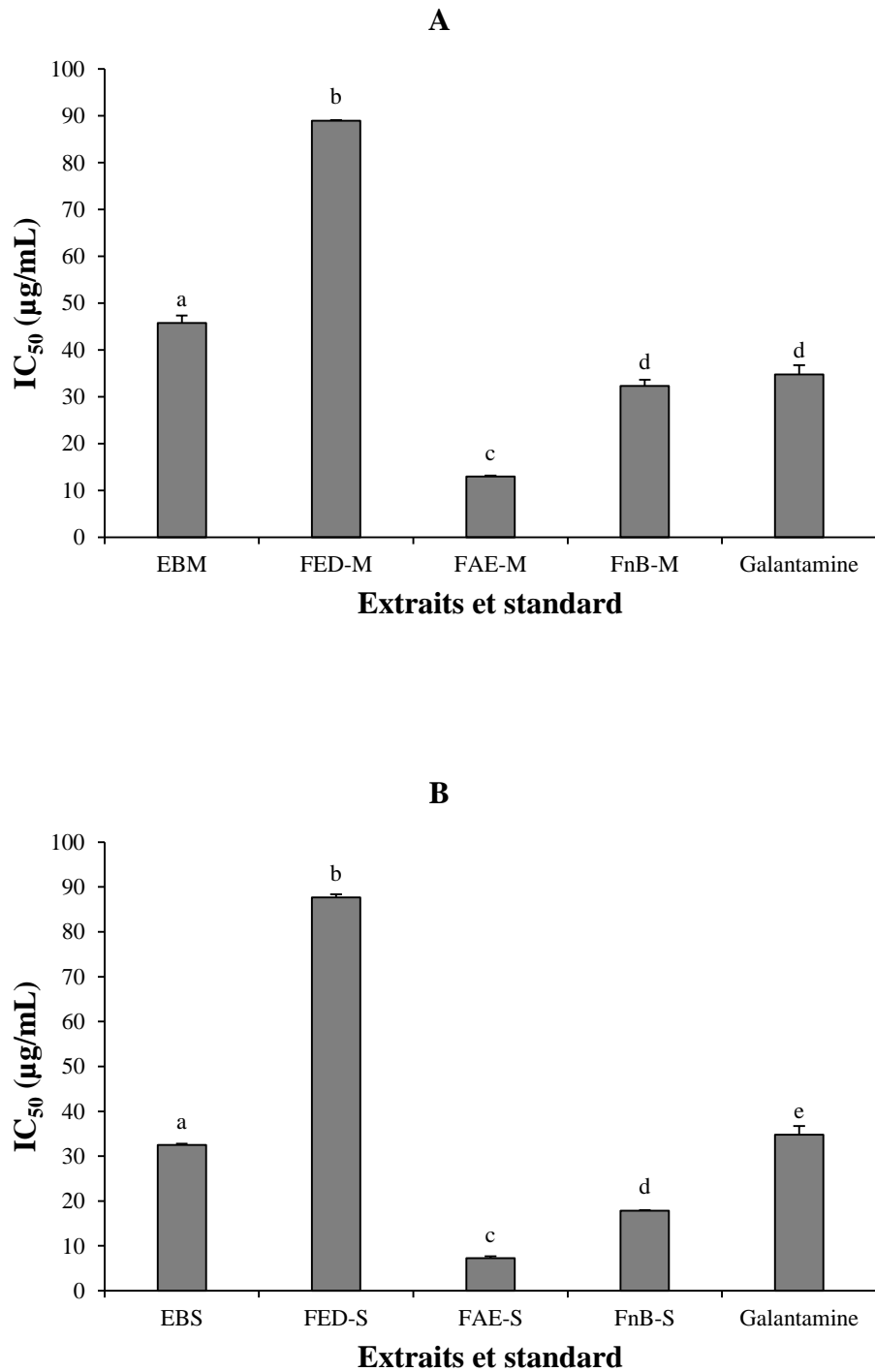


Figure 52: Valeurs des CI₅₀ de l'inhibition de l'BChE de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *M.pulegium* (A) et de *S.chamaecyparissus* (B) et leurs fractions obtenues en comparaison avec la valeur CI₅₀ de la Galantamine.

^{a-e} Les échantillons non reliés par la même lettre sont significativement différents à $p < 0,05$, comme déterminé par les tests à plages multiples de Tukey et Student-Newman-Keul. EBM : Extrait brut hydrométhanolique de *M.pulegium*; FAE-M : Fraction d'acétate d'éthyle de *M.pulegium*; FnB-M : Fraction n-butanol de *M.pulegium*; FED-M : Fraction d'éther diéthylique de *M.pulegium*; EBS : Extrait brut hydrométhanolique de *S.chamaecyparissus*; FAE-S : Fraction d'acétate d'éthyle de *S.chamaecyparissus*;

FnB-S : Fraction n-butanol de *S.chamaecyparissus* ; FED-S : Fraction d'éther diéthylique de *S.chamaecyparissus*.

Les résultats obtenus ont montré que l'ensemble des extraits et fractions de *M. pulegium* et *S.chamaecyparissus* ont enregistré une activité inhibitrice importante vis-à-vis de la BChE. La FAE-M et la FnB-M sont plus actives avec des valeurs de CI_{50} de l'ordre de $12,97 \pm 0,20$ et $32,28 \pm 1,34$ $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Leurs activités est supérieure à celle de la Galantamine ($34,75 \pm 1,99$ $\mu\text{g / ml}$). La FAE-S, FnB-S et EBS ont montré une forte activité inhibitrice vis-à-vis de BChE et qui est meilleure à celle de la Galantamine avec des CI_{50} respectives de l'ordre de $7,25 \pm 0,45$, $17,88 \pm 0,14$ et $32,53 \pm 0,22$ $\mu\text{g/ml}$.

Nous avons tracé une courbe de corrélation linéaire entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI_{50} des différents tests d'inhibition de l'AChE et de l' BChE des différents extraits et fractions de la partie aérienne de *M. pulegium* (Figure 53) et *S.chamaecyparissus* (Figure 54).

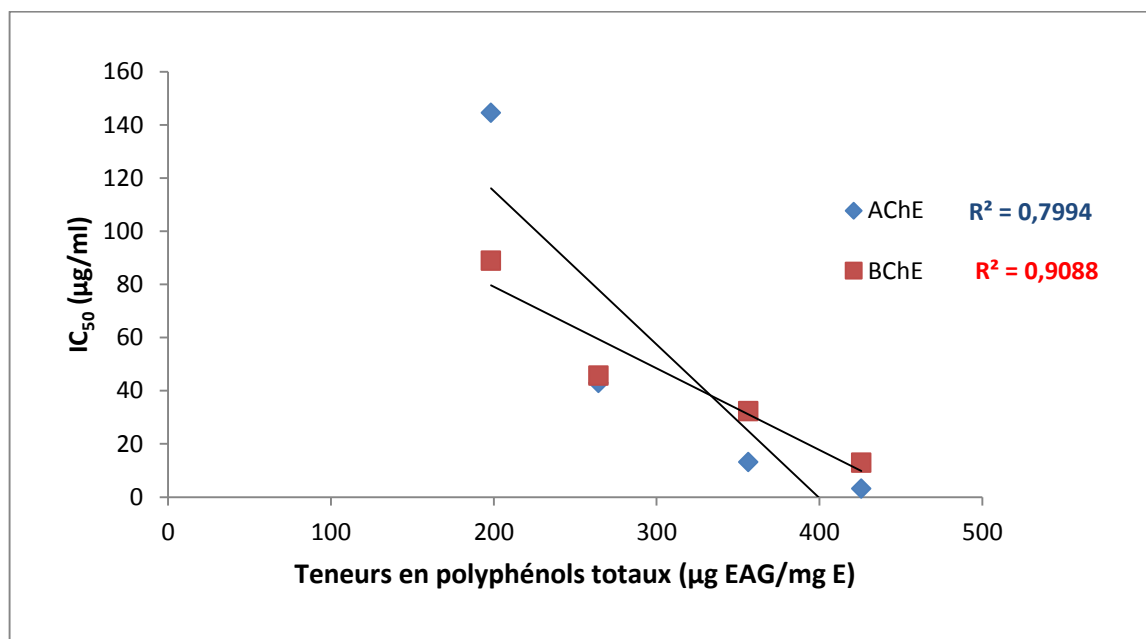


Figure 53: Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI_{50} des différents tests d'inhibition de l'AChE et de l' BChE des différentes fractions de la partie aérienne de *M. pulegium*.

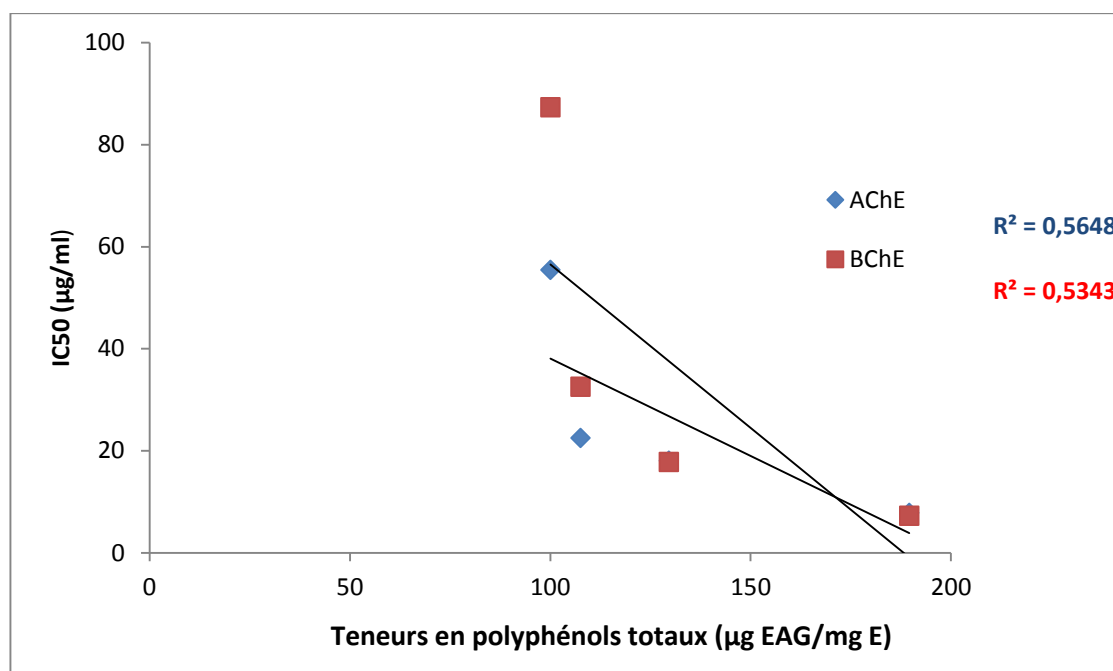


Figure 54:Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les CI_{50} des différents tests d'inhibition de l'AChE et de l' BChE des différentes fractions de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*.

Les résultats obtenus ont montré l'existence d'une forte corrélation entre l'activité inhibitrice de l'AChE et de l' BChE et les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits et fractions de *M. pulegium* (R^2 de l'ordre de 0,799 et 0,908). Cependant une faible corrélation a été estimée entre l'activité inhibitrice de l'AChE et de l' BChE et les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits et fractions de *S. chamaecyparissus* (R^2 de l'ordre de 0,534 et 0,564).

Discussion

L'intérêt accordé à l'étude scientifique des propriétés thérapeutiques des plantes médicinales n'a cessé d'augmenter durant ces dernières années dans le but de rechercher des alternatives aux substances chimiques qui présentent des risques pour la santé humaine et pour l'environnement. L'objectif de la présente étude porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante, anti-hémolytique, antidiabétique et anti-Alzheimer des extraits bruts hydrométhanoliques préparés par macération (72h) de la partie aérienne de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* et leurs fractions riches en composés phénoliques (éther diéthylique, acétate d'éthyle et n-butanol).

L'étude phytochimique des extraits nous a permis de déterminer le rendement de chaque extrait et les résultats obtenus ont montré que les rendements étaient variables et compris entre 3,04 et 19 % pour *M. pulegium* et entre 3,2 et 10,3 % pour *S. chamaecyparissus*.

Les travaux réalisés sur les différents extraits bruts de *M. pulegium* ont révélé que l'extrait aqueux présente le rendement le plus élevé (49,8 %) par rapport aux extraits organiques (hydrométhanolique (13,4%), méthanolique (12,9 %) et éthanolique (8,2 %)) (**Mata et al., 2007, Brahmi et al., 2017**).

Pour *S. chamaecyparissus*, les résultats obtenus ont montré des valeurs proches à celles obtenues par **Djarmouni et al., (2018)** qui ont souligné que les rendements de l'extrait brut hydrométhanolique et la fraction acétate d'éthyle sont respectivement de l'ordre de 9,71% et 1,35%.

Le screening phytochimique effectué sur l'extrait brut hydrométhanolique (EBM) de la partie aérienne de *M. pulegium* préparé par macération et ses fractions riches en composés phénoliques (FAE-M, FnB-M, FED-M) a révélé la présence des tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, quinones libres, coumarines et terpénoïdes. Les saponines ne sont présents que dans l'extrait brut hydrométhanolique (EBM) et la fraction éther diéthylique (FED-M). Les anthraquinones sont absentes dans l'ensemble des extraits. Ces résultats concordent avec ceux de **Zekri et al. (2013)**, qui a révélé la présence des tanins, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des stérols et des triterpènes avec une absence des anthraquinones après des tests phytochimiques réalisés sur différents extraits préparés par décoction et infusion dans différents solvants (éther de pétrole, méthanol, éthanol, chloroforme et eau) de la partie aérienne de *M. pulegium* récoltée au Maroc.

De même, Rajinder et al. (2015) ont révélé la présence des flavonoïdes, des tanins et des terpenoïdes dans les extraits aqueux, chloroformique, acétate d'éthyl et éthanolique des feuilles de *Mentha piperita* de la même famille de *M. pulegium* récoltées en Libye.

Le screening phytochimique effectué sur l'extrait brut hydrométhanolique de *S. chamaecyparissus* et ses fractions (FAE-S, FnB-S, FED-S) a révélé la présence des flavonoïdes, des tanins, des quinones libres, des alcaloïdes, des coumarines et des terpénoïdes. Les saponines ne sont présents que dans l'extrait brut hydrométhanolique (EBS) et la fraction n-butanol (FnB-S).

Au cours de l'étude phytochimique, les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des différents extraits de *M.pulegium* et de *S. chamaecyparissus* ont été quantifiées.

La fraction acétate d'éthyle et la fraction n-Butanol récupérées après fractionnement de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *M. pulegium* et *S.chamaecyparissus* ont enregistré les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux.

Dans la présente étude nous avons noté que l'acétate d'éthyle était le meilleur solvant pour extraire les composés phénoliques de *M. pulegium* et de *S.chamaecyparissus* suivi du n-butanol. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par **Benamar et al. (2018)**.

Nos résultats ont montré la richesse des deux plantes étudiées en composés phénoliques par rapport aux études réalisés par **Gülçin et al. (2020)** qui ont enregistré des teneurs de l'ordre de 53,81 et 59,62 µg EAG/mg E en polyphénols totaux et 43,13 et 48,21 µg EQ/mg E en flavonoïdes totaux dans l'extrait méthanolique et aqueux, respectivement.

Les travaux d'El Aanachi et al. (2021) ont montré que l'extrait méthanolique de *M.pulegium* présente une teneur de l'ordre de $249,30 \pm 11,35$ µg EAG/mg E en polyphénols totaux et de $208,31 \pm 0,73$ µg EQ/mg E en flavonoïdes totaux. **Palić et al. (2015)** ont révélé que l'acétate d'éthyle de la partie aérienne de *M.pulegium* renferme une teneur de l'ordre de 151,00 µg EAG /mg E en polyphénols totaux et de 139,06 µg EQ/mg en flavonoïdes totaux.

Par ailleurs, **Djarmouni et al. (2018)** ont montré que la fraction d'acétate d'éthyle obtenue de l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne de *S.chamaecyparissus* contenait des teneurs de l'ordre de $373,83 \pm 0,23$ µg EAG/mg E en polyphénols totaux et des teneurs de l'ordre de $61,51 \pm 7,86$ µg EQ/mg E en flavonoïdes totaux. De même, l'extrait hydrométhanolique a présenté des teneurs de l'ordre de $196,08 \pm 0,35$ µg EAG/mg E en polyphénols totaux et des teneurs de l'ordre de $16,94 \pm 1,96$ µg EQ/mg E en flavonoïdes totaux. **Labeled et al. (2017)** ont obtenu une teneur en polyphénols totaux de l'ordre de $240,2 \pm 0,00$ µg EAG/mg E pour la fraction n-butanol de l'extrait hydroéthanolique de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*.

La variation des rendements des extractions de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* par rapport à la bibliographie ainsi que les variations des résultats des tests quantitatifs et qualitatifs des composés phénoliques sont probablement liées à certains facteurs, notamment la polarité du solvant, le temps, la température et la méthode utilisée pour l'extraction (**Herrera et al., 2018 ; Jiménez-Moreno et al., 2019 ; Barakat et al., 2020 ; Bakhouché et al., 2021**). **Ksouri et al. (2008)** et **Kumar et al. (2017)** ont signalé que ces variations dépendent également des conditions environnementales dans lesquelles la plante a été cultivée, de la région, de la période de récolte, et du stade de développement.

L'analyse RP-HPLC-PDA a révélé que l'acide gallique, l'acide *p*-coumarique, l'acide férulique, la naringénine et la quercétine sont les principaux composés phénoliques identifiés dans les fractions FAE-M et FnB-M de *M.pulegium*. L'acide gallique, la naringénine, la quercétine et la rutine ont été caractérisés dans les fractions FAE-S et FnB-S de *S.chamaecyparissus*, sachant que la quercétine est le composant le plus abondant dans les fractions analysées des deux plantes.

Certains composés phénoliques caractérisés par LC-DAD-MS ont été détectés dans les infusions du *M.pulegium* comme les acides *p*-hydroxybenzoïque, férulique, caféique, vanilique, syringique, protocatéchique, cinnamique, phlorétique, *p*-coumarique ainsi que la catéchine, l'épicatéchine, la chryisine, la quercétine, la naringénine et le carvacrol (**Kogiannou et al., 2013**).

L'analyse LC-MS/MS des extraits aqueux et méthanoliques de *M. pulegium* (espèce originaire de Turquie) a montré la présence de Kaempférol-3-O-rutinoside, la quercétagétine-3,6-diméthyléther, l'acide fumarique, l'acide chlorogénique, l'apigénine et l'épicatéchine (**Gülçin et al., 2020**).

De plus, l'analyse LC-PDA-ESI/MS réalisée sur l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* a montré que les composés phénoliques dominants sont les acides phénoliques (acide chlorogénique et acide 3,5-O-di-caféoylquinique) et les flavonoïdes (lutéoline 7-O- β -D-glucoside, apigénine di-glucoside et apigénine 7-O-rutinoside) (**Béjaoui et al., 2016**).

Tout ce qui est naturel n'est pas toujours sain. Les plantes médicinales malgré leurs effets thérapeutiques doivent être utilisées avec la plus grande prudence, car elles peuvent avoir un risque de toxicité (**Fouché et al., 2000**). L'étude de la toxicité des composés phytochimiques

est une étape primordiale de la recherche des propriétés pharmacologiques. Pour cette raison l'étude de la toxicité a été réalisée.

Dans la présente étude, les globules rouges humains ont été choisis comme modèle cellulaire pour étudier la toxicité *in vitro* des extraits bruts hydrométhanoliques de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* et de leurs fractions en se basant sur leur hémolyse qui est un phénomène irréversible par lequel les membranes des globules rouges sont détruites, ce qui permet la fuite du contenu en hémoglobine (Sebahoun, 2006). De plus, les globules rouges sont largement utilisés comme modèle universel pour étudier la cytotoxicité (Phuse et Khan, 2018).

Les résultats obtenus ont prouvé que l'ensemble des extraits étudiés de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* ne sont pas toxiques vis-à-vis des globules rouges humains, à l'exception de l'extrait brut hydrométhanolique des deux plantes étudiées qui a enregistré un taux d'hémolyse le plus élevé ($7,41 \pm 0,12$ % pour *M. pulegium* et $9,32 \pm 0,17$ % pour *S. chamaecyparissus*) à une concentration de 200 mg/ml.

Les taux d'hémolyse observés pour les différents extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* peuvent être attribués à la présence des alcaloïdes et des saponines, comme le montre le screening phytochimique.

La toxicité des composés phytochimiques peut affecter plusieurs aspects moléculaires des globules rouges. La quinidine est un alcaloïde qui peut provoquer l'hémolyse des hématies par déficit en G6PD (glucose 6 phosphate déshydrogénase) (Visseaux, 2011). Le déficit en G6PD s'exprime essentiellement dans les globules rouges car elles n'ont pas d'autre source de NADPH. Lorsque la G6PD est très peu active, la production de NADPH est insuffisante pour protéger les principaux constituants des globules rouges, à savoir la membrane et l'hémoglobine, contre les agents oxydants, favorisant ainsi l'hémolyse (destruction des globules rouges) (Gurbuz et al., 2004 ; Dalal et al., 2005). En outre, les saponines ont des propriétés hémolytiques. Cette propriété est attribuée à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire. L'interaction induit une augmentation de la perméabilité membranaire et un mouvement d'eau et des ions : le sodium et l'eau entrent, le potassium fuit, la membrane éclate, permettant ainsi la fuite de l'hémoglobine (Bruneton, 2008 ; Das et al., 2012).

Les antioxydants naturels ont attiré beaucoup d'attention au cours des dernières décennies en raison de leurs propriétés thérapeutiques sur la santé humaine et peuvent constituer une

alternative importante meilleure à celle des antioxydants de synthèse, qui peuvent avoir des effets toxiques et mutagène (**Armend´ariz-Barrag´an et al., 2016 ; Taslimi et al., 2020 ; Türkan et al., 2020**).

En raison de la grande diversité dans la composition phytochimique des plantes médicinales et des processus oxydatifs, il est important d'évaluer l'activité antioxydante des extraits des plantes en utilisant diverses méthodes pour prendre en compte les différents mécanismes d'action de chaque composé (**Inchuen et al., 2010**). Pour cela l'activité antioxydante des extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* a été évaluée en utilisant différents tests.

Suite à la simplicité, la rapidité d'analyse et à la grande stabilité du radical la méthode du piégeage du radical DPPH \cdot a été choisie pour évaluer l'activité antiradicalaire des extraits des deux plantes.

La meilleure capacité de piégeage du radical DPPH \cdot a été enregistrée pour les fractions acétate d'éthyle et n-butanol des deux plantes étudiées avec des valeurs d'CI₅₀ de l'ordre de 8,35±0,22 et 8,44±0,03 µg/ml, respectivement pour *M. pulegium* et de l'ordre de 6,74± 0,09 et 8,54±0,01 µg/ml pour *S. chamaecyparissus*, respectivement. Cette activité est supérieure à celle de l'antioxydant de synthèse, BHT et très proche à celle de BHA.

Nos valeurs de CI₅₀ restent plus intéressantes par rapport à celles déterminées par **Ghazghazi et al. (2013)** dans l'extrait méthanolique des feuilles de *M. pulegium* récoltées en Tunisie (CI₅₀=56 µg/ml) ; par **Teixeira et al. (2012)**, dans l'extrait aqueux de la partie aérienne de *M. pulegium* récoltée en Portugale (CI₅₀=16,3 µg/ml) ; et par **El Aanachi et al. (2021)**, dans l'extrait méthanolique des feuilles de *M. pulegium* récoltées au Maroc (CI₅₀=10,16µg/ ml).

Labed et al. (2017) et **Djarmouni et al. (2018)** ont obtenu de faibles résultats avec la fraction n-butanol de l'extrait hydroéthanolique (CI₅₀ = 28,11±0,02 µg /ml) ainsi qu'avec la fraction d'acétate d'éthyle obtenue de l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* (CI₅₀ = 10 ± 0,00 µg / ml), respectivement.

Nous avons ainsi évalué l'activité antioxydante en utilisant la technique du piégeage du radical ABTS $^{+\cdot}$. ABTS $^{+\cdot}$ est un radical plus réactif que le DPPH \cdot , il implique le transfert d'atomes d'hydrogène et d'électrons. Sa solubilité dans l'eau et les solvants organiques lui donnent un caractère plus polyvalent que le DPPH \cdot , ce qui permet l'évaluation de la capacité de piégeage des molécules phytochimiques de nature lipophiles et hydrophiles.

D'après les résultats obtenus nous avons remarqué que les deux fractions acétate d'éthyle et n-butanol des deux plantes étudiées ont présenté une capacité de piégeage du radical ABTS $^{+\cdot}$

supérieure à celle de Trolox et proche de BHA et BHT avec des CI_{50} de l'ordre de $5,17 \pm 0,08$ et $8,29 \pm 0,82$ $\mu\text{g/ml}$ pour *M. pulegium* et de l'ordre de $4,28 \pm 0,04$ et $5,17 \pm 0,13$ $\mu\text{g/ml}$ pour *S. chamaecyparissus*, respectivement.

En revanche nos résultats sont plus importants par rapport à ceux d'El **Aanachi et al. (2021)** qui ont obtenu une CI_{50} de l'ordre de $12,43$ $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait méthanolique des feuilles de *M. pulegium* récoltées au Maroc.

Djarmouni et al. (2018) ont signalé que la fraction d'acétate d'éthyle obtenue de l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* a présenté une faible activité de piégeage du radical ABTS^{•+} ($CI_{50} = 8,5 \pm 9,4$ $\mu\text{g/ml}$) par rapport à celle obtenue dans nos extraits.

Le radical galvinoxyl (GOR) est un radical stable centré sur l'oxygène (O-centred galvinoxyl radical) il est similaire au radical DPPH, mais ce dernier est un radical centré sur l'azote. Les résultats de piégeage du radical galvinoxyl (GOR) ont montré que les fractions acétate d'éthyle, n-butanol et l'extrait brut hydrométhanolique de *M.pulegium* possède un potentiel de piégeage du radical significativement similaire à celle des antioxydants de synthèse BHT et BHA, avec des CI_{50} de l'ordre de $2,29 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$, de $5,67 \pm 1,08$ $\mu\text{g/ml}$ et $5,87 \pm 0,03$ $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Pour *S. chamaecyparissus*, la fraction acétate d'éthyle (FAE-S) est la plus active ($CI_{50}=8,38 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$).

Le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est biologiquement très toxique pour les composés cellulaires en tant que précurseur de l'oxygène singulet et du radical hydroxyle. La neutralisation de ce radical par l'utilisation d'antioxydant peut prévenir les composés cellulaires de ses effets délétères.

Les résultats obtenus ont montré que la fraction acétate d'éthyle a enregistré une activité de piégeage du radical superoxyde meilleure à celle des standards, BHT et l'acide ascorbique, avec des CI_{50} de l'ordre de $7,01 \pm 0,03$ $\mu\text{g/ml}$ pour *M. pulegium* et de l'ordre de $9,34 \pm 2,38$ $\mu\text{g/ml}$ pour *S. chamaecyparissus*, respectivement.

Ces résultats sont plus intéressants par rapport aux travaux de **Djarmouni et al. (2018)** qui ont enregistré une CI_{50} de l'ordre $57 \pm 6,65$ $\mu\text{g/ml}$ pour la fraction d'acétate d'éthyle obtenue de l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne *S. chamaecyparissus*.

La technique **PAOT-Liquide**® est un test électrochimique qui estime directement la capacité antioxydante totale via le décalage de potentiel électrique dû aux changements de concentration des formes oxydées / réduites du médiateur des radicaux libres (M^{\cdot}) lors de la

réaction avec les antioxydants présents dans les différents extraits testés (**Pincemail et al., 2019 ; Meziane et al., 2021**). Les résultats ont montré que la fraction acétate d'éthyle (FAE-M) et n-Butanol (FnB-M) de *M. pulegium* et la fraction acétate d'éthyle de *S. chamaecyparissus* (FAE-S) ont enregistré l'activité antioxydante la plus élevée. Nous avons remarqué que cette activité est fortement corrélée avec les teneurs en composés phénoliques (Polyphénols et flavonoïdes totaux). Les fractions possédant les teneurs les plus élevées ont démontré le potentiel antioxydant le plus élevé.

Pour la méthode de CUPRAC, la fraction acétate d'éthyle de *M. pulegium* (FAE-M) a présenté une activité significativement similaire à celle de BHT et très proche à celle de BHA. La fraction acétate d'éthyle de *S. chamaecyparissus* (FAE-S) été également la plus active.

Pour la méthode de FRAP, les résultats obtenus ont révélé que tous les extraits de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* ont montré une forte capacité de réduction des ions de fer et des ions cuivriques qui est supérieure à celui de l' α -tocophérol. Cependant, les deux fractions acétate d'éthyle et n-butanol des deux plantes sont les plus actives avec une activité proche à celle de l'acide ascorbique et l'acide tannique.

Il a été rapporté que l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de *M. pulegium* exercent une grande capacité à réduire les ions de fer et les ions cuivriques (**Gülçin et al., 2020**). Cependant, une étude réalisée par **Palić et al. (2015)** sur des extraits d'acétate d'éthyle et de méthanol de *M. pulegium* a montré une faible capacité à réduire les ions cuivriques.

Pour la méthode de phénanthroline, les résultats ont montré que le pouvoir réducteur le plus puissant a été enregistré avec la fraction FAE-M de *M. pulegium* ($A_{0,5} = 8,70 \pm 0,09$) et la fraction FAE-S de *S. chamaecyparissus*.

Ce potentiel réducteur élevé des ions de fer et des ions cuivriques pourrait être principalement dû à la présence des teneurs élevées en composés phénoliques qui sont connus par leur capacité d'interagir avec les métaux de transition comme Cu^{2+} et Fe^{2+} (**Pietta, 2000 ; Heim et al., 2002**). Ainsi, ce potentiel pourrait également être attribué à la richesse des différents extraits de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* en flavonoïdes qui ont été identifiés par RP-HPLC-PDA. En effet, cette classe de métabolites secondaires peut agir comme de puissants agents réducteurs. La propriété réductrice est l'un des mécanismes exercés par les composés antioxydants, qui peut se référer à la capacité de ces composés à régénérer un autre composé déjà oxydé par les radicaux libres ou à arrêter la réaction en chaîne des radicaux libres (**Jayaprakasha et al., 2001**).

Enfin, l'activité antioxydante des extraits a été déterminée par la méthode de blanchissement du β -carotène. Le test mesure la capacité des extraits de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* à piéger les radicaux libres générés suite à l'oxydation de l'acide linoléique par le peroxyde d'hydrogène et à protéger le β -carotène contre l'oxydation (blanchissement). Les fractions acétate d'éthyle et n-butanol des deux plantes ont montré l'effet protecteur le plus élevé, avec des valeurs respectives de CI_{50} de l'ordre de $28,40 \pm 0,57$ et $69,63 \pm 2,41$ $\mu\text{g/ml}$ pour *M.pulegium* et de $46,25 \pm 0,69$ $\mu\text{g/ml}$ et $106,63 \pm 1,15$ $\mu\text{g/ml}$ pour *S.chamaecyparissus*.

Nos résultats sont plus intéressants par rapport à ceux de **Mata et al. (2007)** qui ont enregistré une faible capacité à protéger le β -carotène de l'oxydation avec des CI_{50} de l'ordre de 165 ± 7 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait éthanolique et $167 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait aqueux de *M. pulegium*.

Une étude réalisée par **Djarmouni et al. (2018)** sur les extraits d'acétate d'éthyle et hydrométhanolique de *S.chamaecyparissus*, a montré également une faible capacité par rapport à nos résultats. La structure et le caractère lipophile des antioxydants sont les facteurs déterminants de l'inhibition de la peroxydation lipidique en raison de leurs capacités d'interagir et de s'incorporer dans les bicouches lipidiques (**Djeridane et al., 2010 ; Gali et Bdjou. 2019**). D'autres rapports ont montré que les différences de solubilité des flavonoïdes et la partition de ces composés dans un système micellaire (eau-lipides) influencent leurs activités. De plus, les flavonols avec un groupe hydroxyle en position C-3 du squelette de base présentent une forte inhibition de l'oxydation du β -carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (**Burda et Oleszek, 2001**).

D'après les résultats obtenus nous avons remarqué une relation étroite entre l'activité antioxydante et les teneurs en composés phénoliques. Cependant, la fraction d'acétate d'éthyle et la fraction n-butanol, qui ont la plus grande teneur en composés phénoliques ont également l'activité antioxydante la plus forte. Nos résultats sont en accord avec un grand nombre de recherches où l'activité antioxydante s'est avérée en bonne corrélation avec les teneurs en composés phénoliques et leurs activités antioxydantes (**N'guessan et al., 2007 ; Sarikurkcu et al., 2008 ; Gali and Bdjou, 2019**). En raison de la structure de ces composés portant des groupes hydroxyles, ils peuvent agir comme de puissants antioxydants par transfert d'électrons ou d'atome d'hydrogène, ce qui est appelé relation structure-activité (**Tsao, 2010 ; Teixeira et al., 2012 ; Minatel et al., 2017 ; Tanase et al., 2019**). Une étude de la relation structure-activité a montré que l'emplacement des groupes $-\text{OH}$ et $-\text{OCH}_3$ peut augmenter ou diminuer l'activité antioxydante des composés phénoliques. En particulier, les composés ayant un second

–OH en position ortho ou para présente une activité antioxydante plus élevée qu'en position méta (**Muhammad et al., 2016**). Certaines études ont montré que la relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur capacité à piéger les radicaux libres dépend du nombre, de polarité et de position des groupements hydroxyles, et de la nature des substituant sur les cycles (**Karamac et al., 2005 ; Tabart et al., 2009**).

En effet, les flavonoïdes sont probablement les composés phénoliques naturels les plus importants. Ces composés possèdent un large spectre d'activités biologiques, y compris les propriétés anti-radicalaires (**Djeridane et al., 2010**). De plus, l'acide gallique, l'acide *p*-coumarique, l'acide férulique, la naringénine, la rutine et la quercétine qui sont caractérisés par RP-HPLC-PDA ont déjà montré des effets biologiques et thérapeutiques, notamment des activités antioxydantes, anticancéreuses et anti-inflammatoires (**Alam et al., 2014 ; Oyedeji et al., 2014 ; Ademosun et al., 2016**). La présence des groupements hydroxyles présents dans les différentes molécules détectées par RP-HPLC-PDA ainsi que leurs l'effet synergique aurait pu contribuer aux fortes activités antioxydantes des fractions acétate d'éthyle et n-butanol.

L'utilisation des plantes médicinales aux propriétés anti-hémolytiques pourrait empêcher la détérioration des cellules par les différents processus d'oxydation. A cet effet, nous avons évalué *in vitro* l'effet protecteur de l'extrait brut hydrométhanolique de la partie aérienne de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* et de ses fractions obtenues sur la préservation de l'intégrité érythrocytaires. Les érythrocytes ont été choisis comme modèle cellulaire pour cette étude *in vitro* parce que se sont des cibles privilégiées des radicaux libres, en raison de la présence à la fois d'une forte concentration membranaire d'acides gras polyinsaturés et le transport d'oxygène associé aux molécules d'hémoglobines (**Ebrahimzadeh et al., 2009**).

Les résultats ont montré que les fractions d'acétate d'éthyle, n-butanol et éther diéthylique de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* présentent l'activité anti-hémolytique la plus puissante. Cette activité est meilleure que celle de l'acide ascorbique, utilisé comme standard. A une concentration de 80 µg/ml, la fraction acétate d'éthyle des deux plantes a présenté les HT₅₀ les plus importants de l'ordre de 236,35±2,98 min pour *M. pulegium* et 239,3±3,75 min pour *S. chamaecyparissus*.

Belkhiri et al. (2017) ont signalé que les flavonoïdes interagissent avec les surfaces des membranes biologiques empêchant leur lyse et piégeant les espèces réactives de l'oxygène. **Asgary et al. (2005)** ont montré que les flavonoïdes protègent les globules rouges de l'hémolyse par inhibition de l'oxydation par le tetrathionate des groupements thiol (–SH) des

membranes érythrocytaires. De plus, **Ramchoun et al. (2015)** ont indiqué que les flavonoïdes interagissent avec les têtes polaires des phospholipides membranaires par des liaisons hydrogènes. Ces composés ont tendance de s'accumuler dans les membranes biologiques du côté extra et intra cellulaire et ceci pourrait maintenir l'intégrité membranaire en réduisant l'accès des molécules radicalaires à la bicouche lipidique.

Fiorani et al. (2003) ont démontré que la quercétine s'accumule en grandes quantités dans les globules rouges et agit en tant que substrats intracellulaires des enzymes anti-oxydantes à activité oxydo-réductase trans-membranaires.

Par ailleurs, une étude réalisée par **Asgary et al., 2005** a montré que la rutine a entraîné une inhibition de l'hémolyse de 42,5% à une concentration de 10 µg/ml suivi par la quercétine qui a inhibé l'hémolyse de 35,5%.

D'après les études précédentes, la meilleure activité anti-hémolytique exercée par les différentes fractions de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* est probablement due à sa richesse en composés phénoliques ainsi que leurs pouvoirs anti-radicalaires. Cependant la fraction acétate d'éthyle de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* qui a enregistré l'effet anti-radicalaire le plus puissant a présenté l'activité anti-hémolytique la plus élevée. Cette activité peut être due également à la synergie entre cette fraction et les antioxydants endogènes du sang (enzymatique ou non enzymatique).

Le traitement du diabète sucré repose sur différentes classes de médicaments hypoglycémisants oraux. L'un d'eux est l'inhibition des enzymes clés du système digestif (α -amylase et α -glucosidase) qui sont impliquées dans la dégradation des glucides et l'absorption intestinale (**Alqahtani et al., 2020**). Certains médicaments pharmaceutiques comme l'acarbose, le voglibose et le miglitol sont utilisés comme inhibiteurs de l' α -amylase et l' α -glucosidase. Cependant, ces médicaments présentent des effets secondaires, qui limitent leur utilisation clinique et rendent nécessaire la recherche d'une source naturelle d'inhibiteurs efficaces avec plus d'activité et moins ou pas d'effets secondaires.

Dans la présente étude, nous avons évalué *in vitro* la capacité des extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* et leurs fractions à inhiber les deux enzymes α -amylase et α -glucosidase. D'après les résultats obtenus nous avons remarqué que l'ensemble des extraits possèdent la capacité d'inhiber les deux enzymes. Par ailleurs, les fractions FAE-M ($CI_{50} = 16,37 \pm 0,11$ µg/ml) FAE-S ($CI_{50} = 13,73 \pm 0,41$ µg/ml) et FnB-S ($CI_{50} = 26,26 \pm 1,37$ µg/ml)

ont montré l'activité inhibitrice la plus importante. Cette activité inhibitrice est meilleure que celle de l'Acarbose ($CI_{50} = 31,03 \pm 1,98 \mu\text{g/ml}$).

Pour l' α -glucosidase, les résultats ont montré que les fractions FAE-M et FnB-M de *M.pulegium* ont présenté une activité inhibitrice meilleure que celle de l'Acarbose avec des CI_{50} de l'ordre de $61,85 \pm 1,69 \mu\text{g/ml}$ et $133,25 \pm 1,54 \mu\text{g/ml}$, respectivement. De même, l'extrait brut hydrométhanolique de *S. chamaecyparissus* et ses fractions FED-S, FAE-S et FnB-S ont également enregistré une activité inhibitrice meilleure que celle de l'Acarbose ($CI_{50} = 150,26 \pm 0,88 \mu\text{g/ml}$).

Des activités inhibitrices de l' α -glucosidase et de l' α -amylase ont été précédemment rapportées pour l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *M. pulegium* récoltée en Turquie avec une CI_{50} de l'ordre de 20,38 et 23,11 $\mu\text{g/ml}$, respectivement (Gülçin et al., 2020). D'autres études ont révélé que les extraits de *M. canalenisa* (Wongsa et al., 2012) et *M. longifolia* (Asghari et al., 2018) ont montré une forte inhibition de ces enzymes digestives.

Les travaux d'Abuzer et al. (2021) ont indiqué que l'extrait d'acétate d'éthyle de *S. chamaecyparissus* a inhibé modérément l' α -glucosidase avec une CI_{50} de l'ordre de $110 \pm 4,25 \mu\text{g/ml}$.

Certains produits naturels ont montré un effet inhibiteur de l' α -amylase et de l' α -glucosidase comme les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Sachant que les acides phénoliques et les flavonoïdes sont les meilleurs inhibiteurs (Tadera et al., 2006 ; Wei et al., 2021 ; Wu et al., 2021 ; Lim et al., 2022). L'acide caféique, l'épicatéchine, l'acide férulique, l'acide rosmarinique, la quercétine et le resvératrol sont des inhibiteurs compétitifs de l' α -glucosidase (Rasouli et al., 2017), tandis que la myricétine, la lutéoline et la naringinine sont des inhibiteurs non compétitifs (Tadera et al., 2006 ; Indrianingsih et al., 2015). La myricétine (151,12 $\mu\text{g/ml}$), la lutéoline (103,05 $\mu\text{g/ml}$) et la quercétine (120,93 $\mu\text{g/ml}$) inhibent compétitivement l' α -amylase pancréatique d'origine porcine (Tadera et al., 2006 ; Watcharachaisoponsiri et al., 2016).

Selon la bibliographie, la quercétine et la rutine ont montré une forte activité inhibitrice de l' α -amylase et l' α -glucosidase (Gou et al., 2014 ; Yilmazer et al., 2015 ; Lyu et al., 2019). La structure chimique des flavonoïdes, le nombre de cycles, et la position de leurs groupes hydroxyyles influent sur l'inhibition de ces enzymes. En effet, il a été démontré que les flavonoïdes avec des structures hétérocycliques distinctes du cycle C comme la quercétine

inhibent fortement l'activité de l' α -amylase et que la présence de la double liaison entre C2 et C3 sur le cycle C de la quercétine a été associée à cette activité inhibitrice (**Lim et al., 2022**).

L'amarrage moléculaire (molecular docking) a révélé plusieurs modes d'interaction entre les composés phénoliques et les résidus d'acides aminés qui définissent le site actif de l' α -amylase et l' α -glucosidase. Plusieurs rapports ont révélé la formation des liaisons hydrogènes avec les résidus d'acides aminés du site actif des deux enzymes (**Hua et al., 2018 ; Wu et al., 2018 ; Abdelli et al., 2020**). Les groupes hydroxyle (-OH) des flavonoïdes sont essentiels pour l'inhibition de l' α -amylase, en formant des liaisons hydrogènes entre les groupes -OH et les chaînes latérales des acides aminés du site actif de l'enzyme tels que Asp¹⁹⁷ et Glu²³³ (**Nyambe-Silavwe et al., 2015**). L'acide gallique a formé des liaisons donneur-H et ioniques avec les résidus Asp¹⁹⁷, Arg¹⁹⁵ et ioniques avec His²⁹⁹ du site actif de l' α -amylase, il forme également des liaisons donneur-H avec Asp^{69,532} du site actif de l' α -glucosidase. Tandis que la quercétine a formé deux liaisons donneur-H avec les résidus Asp^{69, 215} et des liaisons accepteur-H avec les résidus His³⁵¹ du site actif de l' α -glucosidase (**Abdelli et al., 2020**).

Récemment, les acides coumarique, férulique et gallique ont été étudiés comme inhibiteurs puissants de l' α -glucosidase (**Wei et al., 2021; Wu et al., 2021**). Ces acides phénoliques ont été identifiés dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanol, ce qui peut expliquer l'effet inhibiteur puissant de ces fractions sur l' α -glucosidase

L'effet inhibiteur de l'extrait d'hydrométhanolique des parties aériennes de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* et de leurs fractions obtenues (éther diéthylique, acétate d'éthyle, n-butanol) pourrait être dû à la présence de quercétine, de naringénine et la rutine dans les extraits. Par conséquent, la fraction d'acétate d'éthyle est le meilleur inhibiteur de l' α -glucosidase et de l' α -amylase, et peut être utilisée pour gérer l'hyperglycémie postprandiale et servir de traitement antidiabétique potentiel.

En effet, les inhibiteurs d'enzyme peuvent agir selon des mécanismes variés, en se combinant soit avec l'enzyme (compétitive avec le substrat ou incompétitive), soit avec le complexe enzyme-substrat (non compétitive), soit avec le substrat lui-même (**Weinman et Mehul, 2004**).

L'hyperglycémie chronique expose les protéines circulantes, principalement l'albumine à une réaction de glycation non enzymatique, qui correspond à une fixation irréversible de sucre réducteur (le glucose) sur les fonctions amines libres des protéines. C'est un mécanisme comprenant plusieurs réactions, conduisant à la formation de composés de structure complexe, souvent fluorescents, c'est les produits de glycation avancés ou AGE (advanced glycation End

product) (Yeh et al., 2017). La formation des AGE est impliquée dans la pathogénèse des complications du diabète et de la MA (Rahbar et Figarola, 2002 ; Chinchansure et al., 2015).

L'inhibition de la formation d'AGE par l'aminoguanidine synthétique (molécule pharmaceutique inhibitrice de la glycation des protéines sériques) a entraîné de graves complications (Spagnuolo et al., 2021). La recherche d'inhibiteurs naturels de la glycation pourrait représenter une approche alternative. Pour cette raison l'effet antiglycant des extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* sur la glycation de l'albumine a été étudié. Les résultats de cette étude ont montré que tous les extraits des deux plantes étudiées possèdent une activité antiglycation importante. Cet effet se traduit en valeurs des CI_{50} très remarquables comprises de $14,37 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ à $117,5 \pm 0,61 \mu\text{g/ml}$. La fraction acétate d'éthyle de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* a enregistré l'activité antiglycation la plus puissante, avec des CI_{50} de l'ordre de $14,37 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ et de $27,72 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$, respectivement. Cette activité est significativement supérieure à celle de la rutine ($CI_{50} = 30,42 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$). Tandis que la fraction n-butanol de *M. pulegium* (FnB-M) ($CI_{50} = 30,34 \pm 0,13 \mu\text{g/ml}$) a enregistré un potentiel inhibiteur significativement similaire à celui de la rutine. Les fractions éther diéthylique de *M. pulegium* (FED-M) et de *S. chamaecyparissus* (FED-S) ont présenté le pouvoir inhibiteur le plus faible.

Récemment, un nombre considérable de travaux scientifiques ont révélé que certaines molécules bioactives sont de puissants inhibiteurs de la glycation des protéines, comme l'acide ascorbique, l'acide férulique, la catéchine, la quercétine et la rutine (Yeh et al., 2017 ; Safari et al., 2018 ; Win et al., 2019 ; Dariya et Nagaraju 2020). De plus, l'effet inhibiteur de l'acide gallique sur la formation des AGE a été confirmé dans des expériences *in vivo et in vitro*, réalisées par Umadevi et al., (2013).

En effet, les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes et les acides phénoliques présentent une forte affinité d'association avec l'albumine et qui sont capables d'inhiber le processus de glycation plus efficacement que l'aminoguanidine (Yeh et al., 2017 ; Tang et al., 2020). Wu et Yen, (2005) ont montré aussi que la quercétine et la rutine réduisent de manière significative la formation des AGE avec des effets plus significatifs que l'aminoguanidine. La rutine et l'acide oléanolique sont des inhibiteurs de l'interaction du glucose avec les protéines, tandis que la catéchine, la quercétine et l'acide gallique sont des inhibiteurs de la formation de la base de schiff. De même, la catéchine et l'acide gallique isolés du thé vert sont des inhibiteurs de la formation de la base de schiff. L'apigénine, la lutéine et la myricétine sont des

inhibiteurs de la formation des produits d'Amadori (**Chinchansure et al., 2015 ; Yeh et al., 2017**).

En outre, la structure des composés phénoliques ainsi que leurs propriétés antioxydantes plutôt qu'à celles de chélation des métaux influencent leurs pouvoirs inhibiteurs de la formation des AGE (**Wu et Yen, 2005 ; Tan et al., 2008 ; Chen et al., 2016**).

L'inhibition de la formation des AGE par les différents extraits de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* est probablement due aux composés phénoliques identifiés tels que l'acide férulique, l'acide gallique, la quercétine, la rutine et leurs pouvoirs antioxydants puissants. Ces composés sont connus par leurs capacité d'inhiber la glycolisation de la BSA par le glucose (**Ou et al., 2017**).

L'acétylcholinestérase (AChE) est la principale enzyme impliquée dans l'hydrolyse de l'ACh dans le système nerveux central et périphérique, un processus important de restauration de la neurotransmission cholinergique. Elle agit pour éliminer l'ACh de la fente synaptique en association avec la butyrylcholinestérase (BChE) (**Scozzafava et al., 2015**). Le traitement de la maladie d'Alzheimer repose principalement sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE), qui visent à limiter la dégradation de l'acétylcholine.

L'effet inhibiteur des extraits de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* vis-à-vis de l'AChE et de la BChE a été évalué et les résultats ont montré que la fraction acétate d'éthyle de *M. pulegium* (FAE-M) a enregistré un pouvoir inhibiteur de l'AChE plus fort ($CI_{50} = 3,13 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$) que celui de la Galantamine ($CI_{50} = 6,27 \pm 1,15 \mu\text{g/ml}$) et des autres extraits. Nos résultats sont plus intéressants par rapport aux études réalisées par **Mata et al. (2007)** et **Gülçin et al. (2020)**.

Pour *S. chamaecyparissus*, la fraction acétate d'éthyle (FAE-S) a montré une forte activité inhibitrice de l'AChE, avec une CI_{50} de l'ordre de $7,82 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$. Cette activité est significativement similaire à celle de Galantamine et supérieure par rapports aux autres extraits.

L'extrait hydroéthanolique et la fraction riche en polyphénols de *S. semidentata* présentent une faible capacité d'inhibition de l'AChE avec des CI_{50} respectives de l'ordre de $923,44 \pm 153,34$ et de $1112,87 \pm 268,41 \mu\text{g/ml}$ (**Gomes et al., 2015**). D'autres membres de la famille des astéracées ont également révélé des propriétés inhibitrices de l'AChE (**Shahwar et al., 2011; Tavares et al., 2011**).

Pour l'activité inhibitrice de la BChE, la fraction acétate d'éthyle et n-butanol de *M. pulegium* ont présenté un effet inhibiteur plus fort à celui de la Galantamine avec une CI_{50} de l'ordre de $12,97 \pm 0,20$ et $32,28 \pm 1,34 \mu\text{g/ml}$, respectivement.

Pour *S. chamaecyparissus*, les fractions acétate d'éthyle, n-butanol et l'extrait brut hydrométhanolique ont montré une forte activité inhibitrice du BChE, avec des CI_{50} de l'ordre de $7,25 \pm 0,45$, $17,88 \pm 0,14$ et $32,53 \pm 0,22$ $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Cette activité est meilleure à celle de la Galantamine ($CI_{50} = 34,75 \pm 1,99$ $\mu\text{g/ml}$).

La différence entre les résultats obtenus dans la présente étude et les travaux qui ont été rapportés sur l'activité inhibitrice de l'AChE et BChE est peut être liée au solvant utilisé pour l'extraction et à la localisation géographique des sites de collecte.

L'amarrage moléculaire (molecular docking) a révélé plusieurs modes d'interaction entre les composés phénoliques et les résidus d'acides aminés qui définissent le site actif de l'AChE et la BChE. La position des groupes hydroxyles des flavonoïdes semble jouer un rôle important dans leurs liaisons avec l'AChE et la BChE et l'amélioration de leurs l'activités inhibitrices (**Katalinić et al., 2010 ; Falé et al., 2012 ; Balkis et al., 2015**). Les groupes hydroxyles de la quercétine et de la rutine forment des liaisons hydrogènes avec les résidus du site actif de la BChE, tandis que les cycles aromatiques étaient impliqués dans les interactions π - π avec les résidus Trp⁸², Phe³²⁹ et Tyr³³² (**Katalinić et al., 2010**). En outre, le groupe hydroxyle au niveau de l'atome C-3 du cycle C, est responsable de la liaison de la quercétine au résidu Trp⁸⁶ du site actif de l'AChE (**Falé et al., 2012**).

Les composés phénoliques tels que les acides phénoliques (l'acide férulique, l'acide *p*-coumarique et l'acide gallique) et les flavonoïdes (la quercétine et la rutine) ont montré un effet inhibiteur important vis-à-vis de l'AChE et de BChE (**Kumar et al., 2009 ; Szwajgier et Borowiec, 2012 ; Orhan et al., 2012 ; Pendota et al., 2013 ; Sheeja Malar et Pandima Devi, 2014 ; Gomathi et al., 2015**).

Une autre étude a montré que l'acide férulique inhibe de manière compétitive l'activité de l'AChE (**Kumar et al., 2009**). La quercétine inhibe de manière compétitive l'activité de l'AChE et de la BChE (**Khan, 2009**). De plus plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré l'effet neuroprotecteur de la rutine (**Enogieru et al., 2018**). Par conséquent, les composés phénoliques identifiés dans la fraction acétate d'éthyle et n-butanol de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* ainsi que leurs teneurs élevées en polyphénols et en flavonoïdes totaux pourraient être liés au potentiel d'inhibition de la cholinestérase observé.

D'autre part, les monoterpènes qui sont les molécules couramment trouvées dans la partie aérienne de *M. pulegium* (**Mohammadhosseini et al., 2021**) et *S. chamaecyparissus* (**Pala-Paul et al., 1999 ; Cherchi et al., 2001**) peuvent être attribués aux propriétés

anticholinestérasiques des extraits. Les monoterpènes sont de puissants inhibiteurs de la cholinestérase, même similaires à la galantamine (**Burčul et al., 2020**).

Il est intéressant de relier l'activité antioxydante, antidiabétique et anti- Alzheimer des extraits à leurs teneurs en composés phénoliques, dans le but de connaître lesquels sont responsables de ce pouvoir. Afin d'explorer cette relation, on a déterminé la corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les différentes activités biologiques étudiées (antioxydante, antidiabétique et anti- Alzheimer). Les composés phénoliques ont montré une corrélation avec chacune de ces activités, ce qui a été confirmé par certains travaux précédents qui ont montré que les teneurs en composés phénoliques sont responsables de l'activité antioxydante, antidiabétique et anti- Alzheimer (**Liu et al., 2008; Turumtay et al., 2014 ; Gali and Bdjou, 2019**).

Conclusion

et

Perspectives

La présente étude est une contribution à l'étude phytochimique et à l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydant, antihémolytique, antidiabétique et anti-Alzheimer des extraits bruts hydrométhanoliques ainsi que leurs fractions (Ether diéthylique, acétate d'éthyle, n-butanol) de la partie aérienne des deux plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle de l'Algérie ; *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus*.

L'étude phytochimique réalisée sur les différents extraits a montré la richesse de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* en composés bioactifs dont les flavonoïdes, les tanins, coumarines, les quinones libres, les alcaloïdes, les saponines et les terpénoïdes et a enregistré des teneurs élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux, notamment dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanol, malgré leurs faibles rendements, comparativement aux extraits bruts hydrométhanoliques.

L'acide gallique, l'acide *p*-coumarique, l'acide férulique, la naringénine et la quercétine sont les principaux composés phénoliques caractérisés dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanol de *M. pulegium*. Tandis que l'acide gallique, la naringénine, la quercétine et la rutine ont été caractérisés dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanol de *S. chamaecyparissus*. La présence de ces composés et d'autres phytoconstituants pourraient être responsables des différentes propriétés biologiques des extraits des deux plantes étudiées.

Le test de la toxicité effectué vis-à-vis de cellules érythrocytaires humaines a montré que l'ensemble des extraits étudiés de *M. pulegium* et de *S. chamaecyparissus* ont présenté des faibles taux d'hémolyse. Les résultats de la recherche de l'activité antioxydante (DPPH, ABTS, GOR, superoxyde, PAOT-Liquide, FRAP, CUPRAC, Phénanthroline, β -carotène), antihémolytique, antidiabétique (inhibition de l' α -amylase et de l' α -glucosidase et l'inhibition de glycation de la BSA) et anti-Alzheimer (inhibition de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase) ont révélé que l'ensemble des extraits de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* ont présenté un effet remarquable, en particulier la fraction acétate d'éthyle qui a enregistré des activités meilleures que celles des molécules standards.

Les résultats de la présente étude suggèrent que l'activité antioxydante, antihémolytique, antidiabétique et anti-Alzheimer des deux plantes *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* pourraient justifier leurs effets thérapeutiques traditionnellement recommandés.

De plus les fractions riches en composés phénoliques pourraient être considérées comme une source prometteuse d'antioxydants naturels qui peut être valorisée pour la prévention et le

traitement des maladies liées au stress oxydatif dont le diabète sucré et la maladie d'Alzheimer.

Ces résultats ne constituent bien évidemment qu'une étape de la recherche. Des études complémentaires approfondies seraient nécessaires, il serait intéressant de :

- ✚ Réaliser une étude phytochimique approfondie qui consiste à l'isolement et la caractérisation des composés actifs contenus dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanol ;
- ✚ Tester les composés actifs isolés pour leurs propriétés thérapeutiques *in vitro* et *in vivo* ainsi que leurs effets synergiques ou en combinaison avec des médicaments conventionnels ;
- ✚ Faire des études de la toxicité aiguë et chronique, *in vivo* des extraits des deux plantes afin de déterminer la sécurité de leurs utilisations comme médicaments ;
- ✚ Elucider des mécanismes d'actions cellulaires et moléculaires via lesquels les extraits des deux plantes étudiées, notamment fractions acétate d'éthyle et n-butanol exercent leurs effets biologiques ;
- ✚ Etudier *in vivo* l'activité antioxydante, antidiabétique et anti-Alzheimer ainsi que les paramètres du stress oxydant.

Références

Bibliographiques

- Abdelli, I., Benariba, N., Adjdir, S., Fekhikher, Z., Daoud, I., Terki, M., Benramdane, H., Ghalem, S., 2020. In silico evaluation of phenolic compounds as inhibitors of α -amylase and α -glucosidase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 39(3), 816-822.
- Abuzer, A., Amena, A., Musarrat, H., W., Wasim, A., Abu, T., 2021. Chemical characterization, antidiabetic and anticancer activities of *Santolina chamaecyparissus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- ADA (Association Américaine du Diabète)., 2009. Therapy for diabetes mellitus and related disorders. Virginia: American Diabetes Association.
- ADA, (American Diabetes Association)., 2014. Diagnosis and classification of diabetes.
- ADA (Association Américaine du Diabète)., 2020. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 43, 14-31.
- ADI (Alzheimer's disease International). World Alzheimer Report 2019: Attitudes to Dementia; Alzheimer's disease Internationals: London, UK, 2019.
- Ademosun, A.O., Oboh, G., Bello, F., Ayeni, P.O., 2016. Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (Rutin) on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* 21(4), 11-17.
- Ahrén, B., 2007. Dpp-4 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 21(4), 517-533.
- Alam, M.A., Subhan, N., Rahman, M.M., Uddin, S.J., Reza, H.M., Sarker, S.D., 2014. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv. Nutr.* 5, 404-417.
- Alqahtani, A.S., Hidayathulla, S., Rehman, M.T., El-Gamal, A.A., Al-Massarani, S., Razmovski-Naumovski, V., Alqahtani, M.S., El Dib, R.A., Al-Ajmi, M.F., 2020. Alpha-amylase and alpha-glucosidase enzyme inhibition and antioxidant potential of 3-oxolupenal and katononic acid isolated from *Nuxia oppositifolia*. *Biomolecules*. 10, 61.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D., Lightfoot, D., 2017. Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*. 6(4), 42.
- Amalich, S., Zerkani, H., Cherrat, A., Dédiandhoua, N., Soro, K., Bourakhouadar, M., Mahjoubi, M., Hilali, E.L., Zair, T.F., 2016. Study on *Mentha pulegium* L. from M'rirt (Morocco): antibacterial and antifungal activities of a pulegone-rich essential oil. *J. Chem. Pharm. Res.* 8, 363-370.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E. Using their cupricion reducing capability in the presence of neocuproine CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7970-7981.
- Armend´ariz-Barrag´an, B., Zafar, N., Badri, W., Galindo-Rodríguez, S.A., Kabbaj, D., Fessi, H., Elaissari, A., 2016. Plant extracts: from encapsulation to application. *Expet Opin. Drug Deliv.* 13, 1165-1175.
- Asgar, A.M. D., 2013. Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review. *International Journal of Food Properties*, 16(1), 91-103.
- Asgary,S., Naderi,G.H., Askari,N., 2005. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp Clin Cardiol.* 10 (2), 88-90.
- Asghari, B., Zengin, G., Bahadori, M.B., Abbas-Mohammadi, M., Dinparast, L., 2018. Amylase, glucosidase, tyrosinase, and cholinesterases inhibitory, antioxidant effects and GC-MS analysis of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha*) essential oil: a natural remedy. *Eur. J. Integr. Med.* 22, 44-49.

Azzi, R., 2013. Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar. Thèse doctorat en biochimie, département biologie, Faculté SNV STU, université Tlemcen(Algérie).

Bahadori, M.B., Asghari, B., Dinparast, L., Zengin, G., Sarikurkcu, C., Abbas-Mohammadi, M., Bahadori, S., 2017. *Salvia nemorosa* L.: a novel source of bioactive agents with functional connections. LWT- Food Sci. Technol. 75, 42-50.

Bahadori, M.B., Dinparast, L., Valizadeh, H., Farimani, M.M., Ebrahimi, S.N., 2016. Bioactive Constituents from Roots of *Salvia Syriaca* L.: Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Molecular Docking Studies. Afr. J. Bot. 106, 1-4.

Bakhouch, I., Aliat, T., Boubellouta, T., Gali, L., Sen, A., Bellik, Y., 2021. Phenolic contents and in vitro antioxidant, anti-tyrosinase, and anti-inflammatory effects of leaves and roots extracts of the halophyte *Limonium delicatulum*. South Afr. J. Bot. 139, 42-49.

Balkis, A., Tran, K., Lee, Y.Z., Ng, K., 2015. Screening Flavonoids for Inhibition of Acetylcholinesterase Identified Baicalein as the Most Potent Inhibitor. J. Agric. Sci. 7.

Barakat, A.Z., Hamed, A.R., Bassuiny, R.I., Abdel-Aty, A.M., Mohamed, S.A., 2020. Date palm and saw palmetto seeds functional properties: antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities. J. Food Meas. Charact. 14, 1064–1072.

Barau, C., Pons, S., Ghaleh, B., & Atkinson, C., 2016. Médicaments antidiabétiques. Pharmacologie Cardio-Vasculaire et Respiratoire, 179-186.

Baron, A. D., 1998. Postprandial hyperglycaemia and α -glucosidase inhibitors. Diabetes Research and Clinical Practice. 40, 51-55.

Barrero, A.F., Mar Herrador, M., Quilez, J.F, Alvarez- Manzaneda, R., Portal, D., Gavin, J.A., Gravalos, D.G., Simmonds, M.S.J., Blaney, W.M., 1999. Bioactive sesquiterpenes from *Santolina rosmarinifolia* subsp. Canescens. A conformational analysis of the germacrane ring. Phytochemistry. 51, 529-541.

Basit, A., Fawwad, A., Qureshi, H., Shera, A. S., NDSP Members. 2018. Prevalence of diabetes, pre-diabetes and associated risk factors: second National Diabetes Survey of Pakistan (NDSP), 2016–2017. BMJ Open. 8, 20961.

Batina, A., 2010. diabétologie maladie métabolique et de nutrition, UNIKIS.

Belkhiri, F., Baghiani, A., Zerroug, M. M., Arrar, L., 2017. Investigation of antihemolytic, xanthine oxidase inhibition, antioxidant and antimicrobial properties of *Salvia verbenaca* L. aerial part extracts African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 14 (2), 273-281,

Benamar, H., Marouf, A., Bennaceur, M., 2018. Phytochemical composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of aqueous extract and fractions of *Pistacia atlantica* subsp. atlantica from Algeria. J. Herbs Spices Medi. 24, 229-244.

Ben Mansour, R., Gargouri, B., Bouaziz, M., Elloumi, N., Belhadj Jilani, I., Ghrabi, Z., Lassoued, S., 2011. Antioxidant activity of ethanolic extract of inflorescence of *Ormenis africana* in vitro and in cell cultures. Lipids in Health and Disease. 10(78),1-7.

Benomari, F.Z., Andreu, V., Kotarba, J., Dib, M.E.A., Bertrand, C., Muselli, A., Costa, J., Djabou, N., 2018. Essential oils from Algerian species of *Mentha* as new bio-control agents against phytopathogen strains. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 29889-29900.

Berger, M.M., 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances : Nutrition clinique et métabolisme. 20, 48-53.

Blicklé, J.F., 2011. Traitement du diabète en dehors de l'insuline. EMC - Endocrinologie-Nutrition. 1-20.

Boussadia, A., Beghidja, A., Gali, L., Beghidja, C., Elhabiri, M., Rabu, P., Rogez, G., 2020. Coordination properties of two new Schiff-base phenoxy-carboxylates and comparative study of their antioxidant activities. Inorg. Chim. Acta 508, 119656.

Bosquet, F., Hartemann-Heurtier, A., 2004. Insulinothérapie dans le diabète de type 2. EMC-Endocrinologie. 1 (1), 55-65

Brahmi, F., Dahmoune, F., Kadri, N., Chibane, M., Dairi, S., Remini, H., Oukmanou-Bensidhoum, S., Mouni, L., Madani, M., 2017. Antioxidant capacity and phenolic content of two Algerian *Mentha* species *M. rotundifolia* (L.) Huds, *M. pulegium* L., extracted with different solvents. Journal of Complementary and Integrative Medicine. 20160064.

Bruneton J. 2009. Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 4è Ed. Éditions médicales internationales (Tec & Doc), Paris, p 1288.

Bruneton, J., 2008. Flavonoïdes. In : Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales, 3è Ed, Technique et Documentation, Paris, p 310-353.

Burcelin., R., Bertolini. M., 2013. Caractéristiques physiologiques et pharmacologiques des agonistes des récepteurs au GLP-1 pour le traitement du diabète de type 2. Médecine des maladies Métaboliques, 7 (4), 331-339.

Burčul, F., Blažević, I., Radan, M., Politeo, O., 2020. Terpenes, phenylpropanoids, sulfur and other essential oil constituents as inhibitors of cholinesterases. Curr. Med. Chem. 27(26), 4297-4343.

Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. J Agr Food Chem. 49, 2774-79.

Burton, G., Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. Best practice and research clinical obstetrics and gynaecology. 25, 287-299.

Caputo, L., Cornara, L., Raimondo, F.M., De Feo, V., Vanin, S., Denaro, M., Trombetta, D., Smeriglio, A., 2021. *Mentha pulegium* L.: A Plant Underestimated for Its Toxicity to Be Recovered from the Perspective of the Circular Economy. Molecules. 26(8), 2154.

Cardon, N., Vaillant, C., Cren, P., Gruffat, B., Rappold, J.P., Corbé, H., 2005. Intoxication aiguë au pesticide organophosphoré et activités des cholinestérases Annales de Biologie Clinique. 63(3), 329-34.

Ceylan, R., Zengin, G., Uysal, S., Ilhan, V., Aktumsek, A., Kandemir, A., Anwar, F., 2016. GC-MS analysis and in vitro antioxidant and enzyme inhibitory activities of essential oil from aerial parts of endemic *Thymus spathulifolius* Hausskn. et Velen. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 31(6), 983-990.

Charbon, G., Bjorn, L., Mendoza-Chamizo, B., Frimodt-Moller, J., Lobner-Olesen, A., 2014. Oxidative DNA damage is instrumental in hyperreplication stress-induced inviability of *Escherichia coli*. Nucleic Acids Research. 42(21), 13228-13241.

Chatelain, C., 2011. Index synonymique de la flore d'Afrique du nord. Dicotyledoneae: Acanthaceae - Asteraceae. Editions des conservatoires et jardins botaniques, Genève, 2 :111.

Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., Sengupta, P.K., 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. Int J Biol Macromol. 41, 42-48.

- Chen, H., Virk, M.S., Chen, F., 2016. Phenolic acids inhibit the formation of advanced glycation end products in food simulation systems depending on their reducing powers and structures. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 67, 400-411.
- Chen, S.C., Qiu, G.L., Li, B., Shi, J.B., Liu, X.H., Tang, W.J., 2018. Tricyclic pyrazolo [1, 5-d][1,4] benzoxazepin-5(6H) one scaffold derivatives: Synthesis and biological evaluation as selective BuChE inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*.10:194-204.
- Cherchi, G., Deidda, D., De Gioannis, B., Marongiu, B., Pompei, R., Porcedda, S., 2001. Extraction of *Santolina insularis* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flavour and Fragrance Journal*. 16, 35-43.
- Chinchansure, A. A., Korwar, A. M., Kulkarni, M. J. and Joshi, S. P., 2015. Recent development of plant products with anti-glycation activity: a review. *RSC Advances*. 5(39), 31113-31138.
- Cotticelli, M.G., Crabbe, A.M., Wilson, R.B., Shchepinov, M.S., 2013. Insights into the role of oxidative stress in the pathology of Friedreich ataxia using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. *Redox Biology*. 1, 398-404.
- Cuellar, M.J., Giner, R.M., Recio, M.C., Just, M.J., Máñez, S., Cerda, S., Ríos, J.L., 1998. Screening of anti-inflammatory medicinal plants used in traditional medicine against skin diseases. *Phytother. Res.* 12, 18-23.
- Dariya, B., Nagaraju, G. P., 2020. Advanced glycation end products in diabetes, cancer and phytochemical therapy. *Drug Discovery Today*. 25(9), 1614–1623.
- Da Silva, J.A.T., 2004. Mining the essential oils of the Anthemideae. *Journal of Biotechnology*. 3(12), 706-720.
- Dalal, B.I., Kollmannsberger, C., 2005. Drug-induced haemolysis and methaemoglobinaemia in glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Br J Haematol*. 129, 291.
- Das, T. K., Banerjee, D., Chakraborty, D., Pakhira, M.C., Shrivastava, B., Kuhad, R.C. 2012. Saponin: Role in Animal system *Vet World*. 5, 248-254.
- Davis, W.J.r., Ronai, Z., Tew, K.D., 2001. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 296(1), 1-6.
- Dellile, A., 2013. *Les plantes médicinales d'Algérie*. 3^{ème} Ed. Berti, 6-144.
- Djarmounil, M., Baghianil, A., Adjadj1, M., Arrar1, L., 2018. Anti-inflammatory and Xanthine Oxidase Inhibition Activities of *Santolina chamaecyparissus*. *Extracts Annual Research & Review in Biology*.22, 6, 1-7.
- Djeddi, S., Djebilec, K., Hadjbourega, G., Achourd, Z., Argyropoulou, C., Skaltsa, H., 2012. In-vitro antimicrobial properties and chemical composition of *Santolina chamaecyparissus* essential oil from Algeria. *Nat. Prod. Comm.*7 (7), 937-940.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J.M., Stocker, P., 2010. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem. Toxicol.*48, 2599-2606.
- Dorman, H.J.D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., Hiltunen, R., 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4563-4569.
- Doucet, J., Bauduceau, B., Blicklé, J.F., 2011. Les inhibiteurs de la dipeptyl-peptidase-4(DPP-) chez le patient âgé diabétique de type 2. *Ger Psychol Neuropsychiatr Vieil*. 9(2), 157-62.

- Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 82, 47-95.
- Důračková, Z., 2008. Oxidants, antioxidants and oxidative stress. In: *Mitochondrial medicine*. Springer Science and Business Media. 19-54.
- Durand, D., Damon, M., Gobert, M., 2013. Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 48, 218-224.
- Ebrahimzadeh, M.A., Ehsanifar, S., Eslami, B., 2009. Sambucus ebulus elburensis fruits. A good source for antioxidants. *Pharmacognosy magazine*. 5, 19, 213.
- El Aanachi, S., Gali, L., Rammali, S., Bensouici, C., Aassila, H., Dari, K., 2021. In vitro study of the antioxidant, photoprotective, anti-tyrosinase, and anti-urease effects of methanolic extracts from leaves of six Moroccan Lamiaceae. *J. Food Meas. Charact.* 15(2), 1785-1795.
- El Haci, I.A., Mazari, W., Atik-Bekkara, F., Mouttas-Bendimerad, F., Hassani, F., 2020. Bioactive compounds from the flower part of *Polygonum maritimum* L. collected from Algerian coast. *Curr. Bioact. Compd.* 16(4), 543-545.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherston, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Enogieru, A.B., Haylett, W., Hiss, D.C., Bardien, S., Ekpo, O.E., 2018. Rutin as a potent antioxidant: Implications for neurodegenerative disorders. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 6241017.
- Falé, P.L.V., Ascensão, L., Serralheiro, M.L., Haris, P.I., 2012. Interaction between *Plectranthus barbatus* herbal tea components and acetylcholinesterase: Binding and activity studies. *Food Funct.* 3, 1176-1184.
- Faure, S., 2017. Biguanides. *Actual pharm.* 50 (506), 51-54.
- Favier, A., 2003. Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*. 108-115.
- Fdil, R., Lmachraa, I., Fdil, N., Ezoubeiri, A., Gadhi, C.A., 2011. Huile essentielle des parties aériennes de *Santolina africana*. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*. 150(1-4) :47-60.
- Feng, B., Li, X., Xia, J., Wu, S., 2017. Discovery of novel isoflavone derivatives as AChE/BuChE dual-targeted inhibitors: synthesis, biological evaluation and molecular modeling. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32(1), 968-977.
- Ferrari, B., Tomi, F., Casanova, J., 2005. Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 33, 445-449.
- FID (Fédération Internationale du Diabète)., 2006. Atlas de Diabète 3ème édition.
- FID (Fédération Internationale du Diabète)., 2017. Atlas de Diabète 8ème édition.
- FID (Fédération Internationale du Diabète)., 2019. Atlas de Diabète 9ème édition.
- Fiorani, M., Accorsi, A., Cantoni, Orazio., 2003. Human Red Blood Cells as A Natural Flavonoid Reservoir. *Free Radical Research*. 37(12), 1331-1338.
- Fontaine, E., 2007. Radicaux libres et vieillissement. *Cah Nutr Diét.* 42 (2), 110-115.
- Fouché, J.G., Marquet, A., Hambuckers, A., 2000. Les plantes médicinales de la plante au médicament .observatoire du monde des plantes sart- tilman.
- Franco, R.o., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M., Panayiotidis, M.I., 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Mutation Research*. 674, 3-22.

- Gali, L., Bedjou, F., 2019. Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*. *South Afr. J. Bot.* 120, 163–169.
- Ghazghazi, H., Aouadhi, C., Maaroufi A., Hasnaoui, B., 2013. Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du nord de Tunisie. *Microbiol. Hyg. Alim.* 25, 37- 41.
- Ghiso, J., Frangione, B., 2002. Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 1539-1551.
- Giner, R.M., Canavate, J.L., 2000. *Santolina chamaecyparissus*: Especie mediterranea con potenciales aplicaciones terapeuticas en procesos inflamatorios y transtornos digestivos. *Revista de Fitoterapia.* 1, 27-34.
- Gomathi, R., Manian, S., 2015. Analgesic and acetylcholinesterase inhibition potential of polyphenols from *Scolopia crenata* (Flacourtiaceae): An endemic medicinal plant of India. *Ind. Crops Prod.* 73, 134-143.
- Gomes, A., Rui, C., Pimpãoa, Fortalezasa, S., Figueiraa, I., Miguela, C., Aguiarc, C., Salgueirod, L., Cavaleirod, C., José Gonc, M., alvesd, Clementee, A., Costae, C, Martins- Louc, M.M, Ricardo, B., Ferreiraa, f., Cláudia, N., Santosa, b., 2015. Chemical characterization and bioactivity of phytochemicals from Iberian endemic *Santolina semidentata* and strategies for ex situ Propagation. *Industrial Crops and Products.* 74, 505-513.
- Gou, L., Zhan, Y., Lee, J., Li, X., Lü, Z.R., Zhou, H.M., Lu, H., Wang, X.Y., Park, Y.D., Yang, J.M., 2014. Effects of L-malic acid on alpha-glucosidase: inhibition kinetics and computational molecular dynamics simulations. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 2232–2245.
- Grosso, C., Cristina, A., Burillo, F.J., Mainar, A.M., Urieta, J.S., Barroso, J.G., Coelho, J.A., Palavra, A.M.F., 2009. Supercritical fluid extraction of the volatile oil from *Santolina chamaecyparissus*. *Journal of Separation Science.* 32, 3215-3222.
- Guignard, J.L., et Dupont, F., 2004. *Botanique: Systématique moléculaire.* 13^{ème} éd. Masson. p 237.
- Gülçin, İ., Gören, A.C., Taslimi, P., Alwasel, S.H., Kılıç, O., Bursal, E., 2020. Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of Anatolian pennyroyal (*Mentha pulegium*)-analysis of its polyphenol contents by LC-MS/MS. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 23, 101441.
- Guo-Xiang L., Zai-Qun L., 2008: The protective effects of ginsenosides on human erythrocytes against hemin-induced hemolysis. *Food and Chemical Toxicology*; 46: 886–892.
- Gurbuz, N., Yalcin, O., Aksu T.A., Baskurt, O.K., 2004. The relationship between the enzyme activity, lipid peroxidation and red blood cells deformability in hemizygous and heterozygous glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient individuals. *Clin Hemorheol Microcirc.* 31, 235-42.
- Gutowski, M., Kowalczyk, S., 2013. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *ACTA biochimica polonica.* 60(1), 1-16.
- Halbron, M., 2009. *Prise en charge thérapeutique du diabète de type 2.* EMC - AKOS (Traité de Médecine).1-7.
- Halimi, A.K., 2014. *Les plantes médicinales en Algérie.* 2^{ème} Ed. BERTI, Alger. p 6-149.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., 1990. "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." *Methods Enzymol.* 186, 1-85.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F., 2004 : Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothér.* 1, 3 – 6.

Harbone, J.B., 1998. *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis.* 3^{ème} Ed. Chapman and Hill, p 303.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572-584.

Herrera, T., Aguilera, Y., Rebollo-Hernanz, M., Bravo, E., Benítez, V., Martínez-Saez, N., Arribas, S.M., del Castillo, M.D., Martín-Cabrejas, M.A., 2018. Teas and herbal infusions as sources of melatonin and other bioactive non-nutrient components. *LWT-Food Sci. Technol.* 89, 65-73.

Hua, F., Zhou, P., Wu, H. Y., Chu, G. X., Xie, Z. W., Bao, G.H., 2018. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoid glycosides from Lu'an GuaPian tea: molecular docking and interaction mechanism. *Food & function*, 9(8), 4173-4183.

Hsia, D.S., Grove, O., Cefalu, W.T., 2018. An update on SGLT2 inhibitors for the treatment of diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 24, 73-9.

Hyun, T.K., Kim, H.C., Kim, J.S., 2014. Antioxidant and antidiabetic activity of *Thymus quinquecostatus* Celak. *Ind. Crop Prod.* 52, 611-616.

Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine.* 54(4), 287-293.

Ilibert, H., Hoxha, V., Sahi, L., Courivaud, A., Chailan, C., 2013. Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie. (CIHEAM). p 222.

Inchuen, S., Narkrugs, W., Pornchaloempong, P., 2010. Effect of drying methods on chemical composition, color and antioxidant properties of Thai red curry powder. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 44, 142-151.

Indrianingsih, A. W., Tachibana, S., Dewi, R. T., Itoh, K., 2015. Antioxidant and α -glucosidase inhibitor activities of natural compounds isolated from *Quercus gilva* Blume leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 5(9), 748–755.

Infante-Garcia, C., Garcia-Alloza, M.N., 2019. Review of the Effect of Natural Compounds and Extracts on Neurodegeneration in Animal Models of Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*, 20- 2533.

Islam, T., Ganesan, K., Xu, B., 2019. New insight into mycochemical profiles and antioxidant potential of edible and medicinal mushrooms: A Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms.* 21(3), 237-251.

Ito, C., Itoigawa, M., Onoda, S., Hosokawa, A., Ruabgrungsi, N., Okuda, T., Tokuda, H., Nishino H., Furukawa, H., 2005. Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti-tumor promoting effect. *Phytochemistry.* 66 (5), 567-572.

Jayaprakasha, G.K., Singh, R. P., Sakariah, K., 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry.* 73 (3), 285-290.

Jiménez-Moreno, N., Volpe, F., Moler, J.A., Esparza, I., Ancín-Azpilicueta, C., 2019. Impact of extraction conditions on the phenolic composition and antioxidant capacity of grape stem extracts. *Antioxidants.* 8, 597.

Kamkar, A., Jebelli Javan, A., Asadi, F., Kamalinejad, M., 2010. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1796-1800.

- Kandra, L., 2003. α -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 666, 487-498.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M. Sokmen, A., 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100 (2), 584-589.
- Katalinić, M., Rusak, G., Domaćinović Barović, J., Šinko, G., Jelić, D., Antolović, R., Kovarik, Z., 2010. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 186-192.
- Kelidari, H.R., Alipanah, H., Roozitalab, G., Ebrahimi, M., Osanloo, M., 2021. Anticancer Effect of Solid-Lipid Nanoparticles Containing *Mentha longifolia* and *Mentha pulegium* Essential Oils: In Vitro Study on Human Melanoma and Breast Cancer Cell Lines. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 12(2), 2128-2137.
- Kessler, L., Moreau, F., 2010. Nouveautés thérapeutiques dans le diabète de type 1: Situation actuelle et perspectives, *MT*. 16 (2), 87-95.
- Khan, H., Marya, A.S., Kamal, M.A., Patel, S., 2018. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: current therapeutic standing and future prospects. *Biomed. Pharmacother.* 101, 860-870.
- Khan, M.T.H., Orhan, I., Senol, F.S.S., Kartal, M., Sener, B., Dvorská, M., Smejkal, K., Slapetová, T., 2009. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem. Biol. Interact.* 181, 383-389.
- Khanbaba, K., Ree, T.R., 2001. Tannins: Classification and Definition. *Journal of Royal Society of Chemistry*. 18, 641-649.
- Khonche, A., Huseini, H.F., Abdi H., Mohtashami, R., Nabati, F., Kianbakht, S., 2017. Efficacy of *Mentha pulegium* extract in the treatment of functional dyspepsia: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *J. Ethnopharmacol.* 206, 267-273.
- Kim, J.H., Campbell, B.C., Mahoney, N., Chan K.L., Molyneux, R.J., Balajee A., 2010. Augmenting the activity of antifungal agents against aspergilla using structural analogues of benzoic acid as chemosensitizing agents. *Fungal Biology*. 114(10), 817-824.
- Kim, K., Rioux, L., Turgeon, S.L., 2014. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 98, 27-33.
- Kisiel, W., Dawid-Pač R, Grabarczyk, H., Nowak, G., 2003. Germacrane Derivatives from *Santolina pinnata* subs. *neapolitana*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 58, 793-796.
- Koc, S., Isgor, B.S., Isgor, Y.G., Moghaddam, N.S., Yildirim, O., 2015. The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. *Pharm. Biol.* 53 (5), 746-751.
- Kogiannou, D.A.A., Kalogeropoulos, N., Kefalas, P., Polissiou, M.G., Kaliora, A.C., 2013. Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food Chem. Toxicol.* 61,152-159.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdely, C., 2008. Influence of Biological, Environmental and Technical Factors on Phenolic Content and Antioxidant Activities of Tunisian Halophytes. *C. R. Biol.* 331, 865-873.
- Kunchandy, E., Rao, M., 1990. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*. 58(3), 237-240.

Kumar, P., Singh, V., Singh, D., 2009. Kinetics of enzyme inhibition by active molluscicidal agents ferulic acid, umbelliferone, eugenol and limonene in the nervous tissue of snail *Lymnaea acuminata*. *Phytother. Res.* 23,172-177.

Kumar, S., Yadav, A., Yadav, M., Yadav, J.P., 2017. Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Aloe vera* (L.) Burm.f. *BMC Res. Notes.* 10, 60.

Labed, F., Masullo, M., Cerulli, A., Benayachea, M., Benayache, S., Piacente, S., 2017. Chemical Constituents of the Aerial Parts of *Santolina chamaecyparissus* and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Natural Product Communications.* 12 (10), 1605-1608.

Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K., 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a highpotency natural sweetener: a comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem.* 132, 1121-1132.

Liang, X.T., Fang, W.S., 2006. *Medicinal chemistry of Bioactive Natural Products*. John Wiley and Sons, ed., New York. p. 143-173.

Lim, J., Ferruzzi, M.G., Hamaker, B.R., 2022. Structural requirements of flavonoids for the selective inhibition of α -amylase versus α -glucosidase. *Food Chem.* 370, 130981.

Lmachraa, I., Fdil, R., Fdil, N., Mouzdahir, A., 2014. Huile essentielle de *Santolina africana* (Jord. & Fourr.) du Maroc: Composition chimique et isolement des deux principaux constituants (Essential oil of *Santolina africana* (Jord. & Fourr.) Of Morocco: Chemical composition and isolation of the two major constituents). *Journal of Materials and Environmental Science.* 5(1), 67-72.

Long, J.M., Holtzman, D.M., 2019. Alzheimer disease: An update on pathobiology and treatment strategies. *Cell.* 179, 312-339.

Lordan, S., Smyth, T.J., Soler-Vila, A., Stanton, C., Ross, R.P., 2013. The alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chem.* 141, 2170-2176.

Lou, S.N., Lin, Y.S., Hsu, Y.S., Chiu, E.M., Ho, C.T., 2014. Soluble and insoluble phenolic compounds and antioxidant activity of immature calamondin affected by solvents and heat treatment. *Food Chem.* 161, 246-253.

Lyu, Q., Kuo, T. H., Sun, C., Chen, K., Hsu, C. C., Li, X., 2019. Comprehensive structural characterization of phenolics in litchi pulp using tandem mass spectral molecular networking. *Food Chemistry.* 282, 9-17.

Malešev, D., Kuntiće, V., 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian chemical society.* 72(10), 921-939.

Mannino, G., Di Stefano, V., Lauria, A., Pitonzo, R., Gentile, C., 2020. *Vaccinium macrocarpon* (Cranberry)-Based Dietary Supplements: Variation in Mass Uniformity, Proanthocyanidin Dosage and Anthocyanin Profile Demonstrates Quality Control Standard Needed. *Nutrients.* 12, 992.

Marotti, M., Piccaglia, R., Giovanelli, E., 1994. Effects of planting time and mineral fertilization on Peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. *Flavour and Fragrance J.* 9, 125 - 129.

Marsaudon, E., 2011. *Le diabète connaitre, comprendre, prévenir, les 200 questions clés pour mieux vivre*, éditions Ellébore. 19-20-23-33-34-44-45-115-116.

Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araújo, M. E.M., 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.* 103, 778-786.

- Martono, Y., Yanuarsih, F. F., Aminu, N. R., Muninggar, J., 2019. Fractionation and determination of phenolic and flavonoid compound from *Moringa oleifera* leaves. *Journal of Physics: Conference Series*. 137(1), 012014.
- Maulik, N., McFadden, D., Otani, H., Thirunavukkarasu, M., Parinandi, N.L., 2013. Antioxidants in longevity and medicine. *Oxid Med Cell Longev*, 820679.
- Meziane, S., Magand, J, Mathé, M., Raimond, S., Yvon L., Kaci M.M., 2021. Bioavailability of natural and synthetic vitamins: A significant difference on Oxidative Stress Status (OSS). *Integr Food Nutr Metab*. 8, 1-10.
- Minatel, I.O., Borges, C.V., Ferreira, M.I., Gomez, H.A.G., Chen, C.Y.O., Lima, G.P.P., 2017. Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability in Phenolic Compounds - Biological Activity. Marcos Soto-Hernández, Mariana Palma Tenango, Rosario García-Mateos. (ED). Croatie. 238.
- Miara, M.D., Bendif, H., Rebbas, K., Rabah, B., Hammou, M.A., Maggi, F., 2019. Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *J Herb Med* 16, 100262.
- Miwa, S., Muller, F.L., Beckman, K.B., 2008. The basics of oxidative biochemistry. In: *Oxidative stress in aging. Aging Medicine*. 11-35.
- Moghadam, R.M., Ariaii, P., Ahmady, M., 2021. The effect of microencapsulated extract of pennyroyal (*Mentha pulegium*. L) on the physicochemical, sensory, and viability of probiotic bacteria in yogurt. *J. Food Meas. Charact*. 15, 2625-2636.
- Mohammadhosseini, M., Venditti, A., Mahdavi, B., 2021. Characterization of essential oils and volatiles from the aerial parts of *Mentha pulegium* L.(Lamiaceae) using microwave-assisted hydrodistillation (MAHD) and headspace solid phase microextraction (HS-SPME) in combination with GC-MS. *Nat. Prod. Res*.
- Monnier.L., 2019. *Diabétologie*, 3^{ème} éd Elsevier Masson, Issy-les-Moulineaux, Cedex, 557.
- Montes, M., Valenzuela, L., Wilkomirsky, T., Niedmann, C. 1986. Détermination de la pulégone dans l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. originaire de Chili. *Ann. Pharmaceutiques français*. 44, 133 - 136.
- Mosihuzzman, M., NAHEED, S., HAREEM, S., TALIB, S., ABBAS, G., et ISRAR, M., 2013. Studies on α -glucosidase inhibition and anti-glycation potential of *Iris loczyi* and *ris unguicularis*. *Life Sciences*. 92, 187–192
- Nanjan, M.J., Mohammed, M., Prashantha Kumar, B.R., Chandrasekar , M.J.N., (2018). Thiazolidinediones as antidiabetic agents: a critical review. *Bioorg Chem*. 77, 548-67.
- Niki, T., Mitsubara, I., Seo, S., Ohtsubo, N., Ohashi, Y., 1998. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol*. 39, 500-507.
- N'guessan, J.D., Zirihi, G.N., Kra, A.K.M., Kouakou, K., Djaman, A.J., Guede-Guina, F., 2007. Free radical scavenging activity, flavonoid and phenolic contents of selected Ivoirian plants. *IJONAS*, 4. 425-429.
- Nobuyasu, M., Tadashi, A., Chihiro, S., Hiroyuki, K., Mitsuharu, O., Junichi H., Makoto U., 2002. Screening System for the Maillard Reaction Inhibitor from Natural Product Extracts. *Journal of Health Science*, 48 (6), 520-526.

- Nouasri, A., Dob, T., Krimats, S., Dahmane, D., Toumi, M., Lynda, L., Chelgoume, C., Racheme, F., 2015. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L. of Algeria. *J. Coastal Life Med.* 3 (3), 220-227.
- Nyambe-Silavwe, H., Villa Rodriguez, J., Ifie, I., Holmes, M., Aydin, E., Jane Jensen, M., Williamson, G., 2015. Inhibition of human α -amylase by dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods.* 19, 723-732.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 2000. Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. 1 : 1-79.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 2011. Quality control methods for herbal materials. 43-44.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 2016. Global report on diabetes. Geneva: WHO Press.
- Orban, J., Ghaddab, A., Chatti, O., Ichai, C., 2006. Metformin-associated lactic acidosis. *Annales Francaises D'anesthésie Et De Réanimation.* 25(10), 1046-1052.
- Orhan, I.E, Guner, E., Ozturk, N., Senol, F.S., Erdem, S.A., Kartal, M., Sener, B., 2012. Enzyme inhibitory and antioxidant activity of *Melia azedarach* L. naturalized in Anatolia and its phenolic acid and fatty acid composition. *Ind. Crops Prod.* 37(1), 213-218.
- Ou, J., Huang, J., Wang, M. and Ou, S. 2017. Effect of rosmarinic acid and carnosic acid on AGEs formation in vitro. *Food Chemistry.* 221, 1057-1061.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44, 307-315.
- Oyediji, O., Taiwo, F.O., Ayinde, F.O., Ajayi, O.S, Oziegbe, M., Kelani, M.T., Adewole, A.H., 2014. In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Analysis of Gallic Acid from the Leaves of *Ludwigia, Abyssinica* A. *Rich.* *Eur. J. Med. Plants.* 4(9), 1098-1112.
- Ozturk, M.C., Xu, Q., Cinar, A., 2018. Agent-based modeling of the interaction between CD8+ T cells and Beta cells in type 1 diabetes. *Journal Plos.* 13-19.
- Öztürk, M., Duru, M.E., Kivrak, S., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A., Özler, M.A., 2011. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: a comparative study on the three most edible mushrooms. *Food Chem. Toxicol.* 49(6), 1353-1360.
- Pala-Paul, J., Perez-Alonso, M.J., Velasco-Negueruela, A., Ramos-Vazquez, P., Gomez-Contreras, F., Sanz, J., 1999. Essential oil of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*: first isolation of capillene, a diacetylene derivative. *Flavour and Fragrance Journal.* 14, 131-134.
- Palić, I., Ickovski, J., Djordjevic, A., Mitic, V., Stankov-Jovanovic, V., Stojanovic, G., 2015. Antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and solvent extracts of *Mentha pulegium* L. *Facta Univ. – Ser. Phys. Chem. Technol.* 13, 109–119.
- Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., Zhang, J., Huang, F., 2008. Antioxydant activity of microwave-assisted extract of longan (*Diinocarpus Longan* Lour.) peel, *Food Chemistry.* 106, 1264 -1270.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., Codina, C. 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non-distilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric. Food Chem.*, 50, 6882-6884.
- Pataky, M.W., Yu, C.S., Nie, Y., Arias, E.B., Singh, M., Mendia,s C.L., et al. (2019). Skeletal muscle fiber type-selective effects of acute exercise on insulin-stimulated glucose uptake in insulin-resistant, high-fat-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 316, 695–706.

- Pendota, S.C., Aderogba, M.A., Ndhkala, A.R., Van Staden, J., 2013. Antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Buddleja salviifolia* (L.) Lam. Leaf extracts and isolated compounds. *J. Ethnopharmacol.* 148(2), 515-520.
- Perlemuter, G., Morin, N.H., 2003. *Endocrinologie Diabétologie Nutrition*, 4ème édition. P 409.
- Persson, T., Popescu, B.O., Cedazo-Minguez, A., 2014. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail. *Oxid Med Cell Longev*, ID 427318, 11.
- Pham-Huy A.L., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health: *Int J Biomed Sci.* 4, 89-96.
- Phuse, S.S., Khan, Z.H., 2018. Assessment of hemolytic effect of Cassia flower extracts on human RBCs. *J. drug deliv ther.* 8, 18-20.
- Pickering, A.M., Vojtovich, L., Tower, J., Davies J.A., 2013. Oxidative stress adaptation with acute, chronic and repeated stress. *Free radical biology and medicine.* 55, 109-118.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante : *Nutrition clinique et métabolisme.* 16, 233-239.
- Pincemail, J., Kaci, M.M., Kevers, Claire., Tabart, J., Elle, R. E., Meziane, S., 2019. PAOT-Liquid® Technology: An Easy Electrochemical Method for Evaluating Antioxidant Capacity of Wines Diseases.7,10.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European journal of medicinal chemistry.* 97, 55-74.
- Poljsak, B., Šuput, D., Milisav, I.,2013. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants:When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2013, Article ID 956792, 11 pages.
- Quezada-Calvillo, R., Sim, L., Ao, Z., Hamaker, B. R., Quaroni, A., Brayer, G. D., Nichols, B. L., 2008. Luminal starch substrate brake on maltase-glucoamylase activity is located within the glucoamylase subunit. *The Journal of nutrition.* 138(4), 685-692.
- Quezel, P., Santa, S., 1963. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.* Tome II. Ed. CNRS, Paris, p. 571-1170.
- Rabiei, Z., Solati, K., Amini-Khoei, H., 2019. Phytotherapy in treatment of Parkinson's disease: a review. *Pharmaceutical Biology.* 57(1), 355–362.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2014. Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International.* V2014,1-14. *Biomed Res Int.* 761264.
- Rahbar, S., Figarola, J. L. 2002. Inhibitors and breakers of advanced glycation endproducts (AGEs): a review. *Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabolic Agents.* 2(2), 135-161.
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E.N., Lakshminarasiah, U., Gopas, J., Nishigaki, I., 2014. Antioxidants and human diseases. *Clin. Chim. Acta.* 436, 332–347.
- Ramawat, K.J., Merillon, J.M., 2008. *Bioactives Molecules and Medicinal Plants.* Edition Springer Verlag Berlin Héidelberg.p 379.
- Ramchoun, M., Sellam, K., Harnafi, H., Alem, C., Benlyas, M., Khallouki, F., Amrani, S., 2015. Investigation of antioxidant and antihemolytic properties of *Thymus saturoioides* collected from Tafilalet Region, south-east of Morocco. *Asian Pac J Trop Biomed.* 5(2), 93-100.

- Ramesh, B.N., Rao, T.S.S., Prakasam, A., Sambamurti, K., Rao, K.S.J., 2013. Neuronutrition and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*. 19, 1123-1139.
- Ranjinder, S., Muftah, A.M., Shushni., Belkheir A., 2015. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*. 8, 322-328.
- Rasouli, H., Hosseini-Ghazvini, S. M. B., Adibi, H., Khodarahmi, R., 2017. Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: A virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food and Function*. 8(5), 1942–1954.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231-1237.
- Riaz, Z., Najabat, M.A., Qureshi Z., Mohsin, M., 2020. In vitro investigation and evaluation of novel drug based on polyherbal extract against type 2 diabetes. *J. Diabetes Res*. 2020.
- Riyaphan, J., Jhong, C.H., Lin, S.R., Chang, C.H, Tsai, M.J., Lee, D.N., Weng, C.F., 2018. Hypoglycemic efficacy of docking selected natural compounds against α -glucosidase and α -amylase. *Molecules*. 23(9), 2260.
- Rodrigues, A.M., Vieira Faleb, P.L., Madeiracn, P., Pachecob, R., Florencioc M.H., Ascensaoa, L., Serralheirob, M. L. M., 2020. Phenolic profile and biological activities of decoctions from *Santolina impressa*, a Portuguese endemic species. *Journal of Herbal Medicine*. 21, 100335.
- Safari, M. R., Azizi, O., Heidary, S. S., Kheiripour, N., Ravan, A. P., 2018. Antiglycation and antioxidant activity of four Iranian medical plant extracts. *Journal of Pharmacopuncture*. 21(2), 82-89.
- Sala, A., Recio, M.C., Giner, R.M., Mdfiez, S., Rios, J., 2000. Antiphosphopase A2 and anti-inflammatory activity of *Santolina Chamaecyparissus*. *Life and Sciences*. 66 (2), 35-40.
- Salah-Fatnassi, K.B.H., Hassayoun, F., Cheraif, I., Khan, S., Jannet, H.B., Hammami, M., 2017. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of flower head and root essential oils of *Santolina chamaecyparissus* L., growing wild in Tunisia. *Saudi J. Biol. Sci.* 24, 875-882.
- Sanchez, C., 2017. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2,13-22.
- Sarikurkcuc, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Harmandar, M., 2008. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (lamiaceae) by three different chemical assays. *Bioresour Technol*, 99, 4239-4246.
- Scozzafava, A., Kalin, P., Supuran, C. T., Gülçin, İ. and Alwasel, S. H., 2015. The impact of hydroquinone on acetylcholine esterase and certain human carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 30(6), 941-946.
- Sebahoun, G., 2006. *Hématologie clinique et biologique* 2^{ème} Ed.
- Sebai, E., Abidi, A., Serairi, R., Marzouki, M., Saratsi, K., Darghouth, M.A., Sotiraki, S., Akkari, H., 2021. Essential oil of *Mentha pulegium* induces anthelmintic effects and reduces parasite-associated oxidative stress in rodent model. *Exp. Parasitol.* 225, 108105.
- Sfodera, F., Mattiacci, A., Nosi, C., Mingo, I., 2020. Social networks feed the food supplements shadow market. *Br. Food J.* 122, 1531–1548.
- Shahwar, D., Ullah, S., Raza, M.A., Sana, U., Yasmeen, A., Ghafoor, S., Ahmad, N., 2011. Acetylcholine esterase and antioxidant potential of some members of Asteraceae and Euphorbiaceae. *J. Med. Plants Res.* 5, 7011–7016.

- Shao, B., Bayraktutan, U., 2014. Hyperglycaemia promotes human brain microvascular endothelial cell apoptosis via induction of protein kinase C- β I and prooxidant enzyme NADPH oxidase. *Redox Biol.* 28 (2), 694-701.
- Sheeja Malar, D., Pandima Devi, K., 2014. Dietary Polyphenols for Treatment of Alzheimer's Disease—Future Research and Development. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15(4), 330-342.
- Shi, H., Noguchi, N., Niki, E., 2001. Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods Enzymol.* 335, 157-166.
- Shing, B., Sahu, P.M., Sharma, M.K., 2002. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of triterpenoids from *Strobilanthes callosus* Ness. *Phytomedicine.* 9, 355-359.
- Skyler, J. S., Bakris, G. L., Bonifacio, E., Darsow, T., Eckel, R. H., Groop, L., 2017. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes.* 66, 241-255.
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., LLeonart, M. E., 2013. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews.* 12, 376-390.
- Spagnuolo, L., Della Posta, S., Fanali, C., Dugo, L., De Gara, L., 2021. Antioxidant and Antiglycation Effects of Polyphenol Compounds Extracted from Hazelnut Skin on Advanced Glycation End-Products (AGEs) Formation. *Antioxidants.* 10, 424.
- Stojkovic, D., Smiljkovic, M., Ciric, A., 2019. An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type 2 diabetes. *S Afr J Bot.* 120, 100-103.
- Szwajgier, D., Borowiec, K., 2012. Phenolic acids from malt are efficient acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *J. Inst. Brew.* 118, 40-48.
- Szydłowska-Czerniaka, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., Szlyk, E., 2008. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta.* 76, 899-905.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T., 2006. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 52(2), 149-153.
- Takebayashi J., Chen J., Tai A., 2010. A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis. *In: Armstrong D. Advanced protocols in oxidative stress ii, methods in molecular biology.* 594, 287-296.
- Tan, D.Y., Wang, C.Y., Lo, C.T., 2008. Ho Methylglyoxal: its presence and potential scavengers *Asia Pac J Clin Nutr.* 17(1), 261-264.
- Tanase, C., Cosarca, S., Muntean, D.L. 2019. A Critical Review of Phenolic ompounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules.* 24, 1182.
- Tang, H., Huang, L., Zhao, D., Sun, C., Song, P., 2020. Interaction mechanism of flavonoids on bovine serum albumin: Insights from molecular property-binding affinity relationship. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 239, 118519.
- Tavares, L., Carrilho, D., Tyagi, M., Barata, D., Serra, A.T., Duarte, C.M.M., Duarte, R.O., Feliciano, R.P., Bronze, M.R., Chicau, P., Espírito-Santo, M.D., Ferreira, R.B., Dos Santos, C.N., 2010a. Antioxidant capacity of macaronesian traditional medicinal plants. *Molecules* 15, 2576–2592.
- Thalapaneni, N.R., Chidambaram, K.A., Ellappan, T., Sabapathi, M.L., Mandal, S.C., 2008. Inhibition of carbohydrate digestive enzymes by talinium portulacifolium (forssk) leaf extracts. *J. Compl. Integr. Med.* 11, 5.

- Taslimi, P., K'oksal, E., G'oren, A.C., Bursal, E., Aras, A., Kılıç, O., Alwasel, S., Gülçin, I., 2020. Anti-Alzheimer, antidiabetic and antioxidant potential of *Satureja cuneifolia* and analysis of its phenolic contents by LC-MS/MS. *Arab. J. Chem.* 13, 4528–4537.
- Teixeira, B., Marques, A., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N., Nogueira, J., 2012. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products.* 36, 81-87.
- Toda, S., 2011. Polyphenol content and antioxidant effects in herb teas. *Chin Med.* 2, 29-31.
- Trease, G.E., Evans, W.C., 2002. *Pharmacognosy. Phytochemicals*, 15th ed. Edinburgh, New York: WB Saunders, p 246–249, 391-393.
- Tremblay, M.S., Colley, R.C., Saunders, T.J., Healy, G.N., Owen, N., 2010. Physiological and health implications of a sedentary lifestyle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 35, 725–740.
- Tsao, R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* 2, 1231-1246.
- Türkan, F., Atalar, M.N., Aras, A., Gülçin, I., Bursal, E., 2020. ICP-MS and HPLC analyses, enzyme inhibition and antioxidant potential of *Achillea schischkinii* Sosn. *Bioorg. Chem.* 94.
- Umadevi, S., Gopi, V., Vellaichamy, E., 2013. Inhibitory effect of gallic acid on advanced glycation end products induced upregulation of inflammatory cytokines and matrix proteins in H9C2 (2-1) cells. *Cardiovasc Toxicol.* 13, 396-405.
- Vermerius, W., Nicholson, R., 2006. Isolation and Identification of Phenolic Compounds. In: *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, Dordrecht, p. 35-191.
- Vinayagam, R., Jayachandran, M., Xu, B., 2016. Antidiabetic effects of simple phenolic acids: a comprehensive review. *Phytotherapy research.* 30(2), 184-199.
- Viollet, B., Guigas, B., Garcia, N.S., Leclerc, J., Foretz, M., Andreelli, F., 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci.* 122(6): 253-270.
- Visseaux, C., 2011. *Toxicologie, fiches de synthèse illustrées*. Editions Vernazobres-Greco.
- Wanner, C., Marx N., 2018. SGLT2 inhibitors: the future for treatment of type 2 diabetes mellitus and other chronic diseases. *Diabetologia.* 61, 2134–2139.
- Watcharachaisoponsiri, T., Sornchan, P., Charoenkiatkul, S., Suttisansanee, U., 2016. The α -glucosidase and α -amylase inhibitory activity from different chili pepper extracts. *International Food Research Journal.* 23(4), 1439–1445.
- Wei, M., Tang, M., Wang, L., Cheng, X., Wu, Y., Ouyang, J., 2021. Endogenous bioactive compounds of naked oats (*Avena nuda* L.) inhibit α -amylase and α -glucosidase activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 149, 111902.
- Weidinger, A., Kozlov, A. V., 2015. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules.* 5, 472-484.
- Weinman, S., Mehul, P., 2004. *Toute la biochimie*. Ed. Dunod, Paris. p 452.
- Wémeau, J.L., Vialettes, B., Schlienger, J.L., 2014. Le diabète type 2, In : *Endocrinologie, diabète, métabolisme et nutrition pour le praticien*, ed. Elsevier Mansson, Issy-les-Moulineaux cedex. 227-233.
- Werber, J., Wang, Y.J., Milligan, M., Li, X., Ji, J.A., 2011. Analysis of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences;* 100 (8), 3307-3315.

- Win, H. H., Moe, T. S., Hlaing, T. T., San, M. M., Win, Z. K., Mya, K. M., 2019. Indigenous Myanmar medicinal plants and comparison of their in vitro antioxidant, antiglycation, and antimicrobial activities. *Cogent Biology*. 5(1), 1589634.
- Wongsa, P., Chaiwarit, J., Zamaludien, A., 2012. *In vitro* screening of phenolic compounds, potential inhibition against α - Amylase and α - Glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chem*. 131(3), 964 -971.
- Wszlaki, N., Kuciun, A., Kiss, A., 2010. Screening of traditional European herbal medicines for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Acta Pharm*. 60(1), 119-128.
- Wu, C.H.O., Yen, G.C., 2005. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J Agric Food Chem* .53, 3167-73.
- Wu, M., Yang, Q., Wu, Y., Ouyang, J., 2021. Inhibitory effects of acorn (*Quercus variabilis* Blume) kernel-derived polyphenols on the activities of α -amylase, α -glucosidase, and dipeptidyl peptidase IV. *Food Biosci*. 43, 101224.
- Wu, X., Ding, H., Hu, X., Pan, J., Liao, Y., Gong, D., & Zhang, G., 2018. Exploring inhibitory mechanism of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase relevant to postprandial hyperglycemia. *Journal of functional foods*, 48, 200-209.
- Yaribeygi, H., Lhaf, F., Sathyapalan, T., Sahebkar, A., 2019. Effects of novel antidiabetes agents on apoptotic processes in diabetes and malignancy: implications for lowering tissue damage. *Life Sciences*. 231: 116538.
- Yeh, W.J., Hsia, S.M., Lee, W.H., Wu, C.H., 2017. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: a review of recent findings. *J Food Drug Anal*, 25, 84–92.
- Yilmazer-Musa, Meltem, Griffith, Anneke, M., Michels, Alexander J., Schneider, Erik, F. B., 2015. Inhibition of α -amylase and α -glucosidase activity by tea and grape seed extracts and their constituent catechins. *HHS Public Access*. 60, 8924–8929.
- Zekri, N., Amalich, S., Boughdad, A., El Belghiti, M.A., Zair, T. 2013. Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. oils from Morocco against *Sitophilus Oryzae*. *Mediterranean Journal of Chemistry*. 2, 607-619.
- Zengin, G., Menghini, L., Di Sotto, A., Mancinelli, R., Sisto, F., Carradori, S., Cesa, S., Fraschetti, C., Filippi, A., Angiolella, L., Locatelli, M., Mannina, L., Ingallina, C., Puca, V., D'Antonio, M., Grande, R., 2018. Chromatographic analyses, in vitro biological activities, and cytotoxicity of *Cannabis sativa* L. essential oil: a multidisciplinary study. *Molecules*. 23, 3266.
- Zengin, G., Sarikurkcu, C., Gunes, E., Uysal, A., Ceylan, R., Uysal, S., Gungor, H., Aktumsek, A., 2015. Two *Ganoderma* species: profiling of phenolic compounds by HPLC–DAD, antioxidant, antimicrobial and inhibitory activities on key enzymes linked to diabetes mellitus, Alzheimer's disease and skin disorders. *Food Funct*. 6, 2794-2802.
- Zhang, A., Sun, H., Wang, X., 2013. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *Eur. J. Med. Chem*. 63, 570-577.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 64, 555-559.

ملخص

نبته *Mentha pulegium* ونبته *Santolina chamaecyparissus* نوعان من النباتات الطبية، تستخدمان على نطاق واسع في الطب التقليدي لعلاج العديد من الأمراض. يركز هذا العمل على الدراسة الكيميوبياتية و البحث عن الأنشطة البيولوجية لمستخلصات الخام الهيدروميتانولية المستخرجة من الجزء العلوي للنبتين و جزيئاتهما الغنية بالمركبات الفينولية (اثير ثنائي الإيثيل، أسيتات الإيثيل و ن-بتانول). تم إجراء تحليل التركيب الكيميوبياتي للجزيئات الغنية بالمركبات الفينولية لنبته *M. pulegium* و *S. chamaecyparissus*. باستخدام الفصل الكروماتوغرافي على الإيستانية RP-HPLC-PDA كما تم تحديد إختبار إنحلال الدم من أجل دراسة سمية المستخلصات و جزيئاتها المختلفة على كريات الدم الحمراء البشرية تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة بطرق تعتمد على نقل ذرة الهيدروجين و نقل الإلكترون الفردي. بالإضافة إلى ذلك تم إجراء تقييم الأنشطة المضادة لإنحلال الدم بعد وضع كريات الدم الحمراء مع مستخلصات النبتتين بتركيز مختلفة في وجود AAPH بينما تمت دراسة النشاط المضاد لمرض السكري للمستخلصات من خلال تقييم قدرتهم المثبطة لإنزيمات ألفا أميلاز و ألفا غلوكوزيداز مع إجراء تقييم نشاط مضادات لإرتباط السكر بالبروتين. كما تم تقدير النشاط المثبط للإنزيم أستيل كولين استيراز (AChE) و البوتيريل كولين استيراز (BChE). أظهرت النتائج المتحصل عليها فيما يتعلق بإختبار إنحلال الدم أن جميع المستخلصات ليست سامة على الكريات الدموية الحمراء البشرية باستثناء مستخلصات الخام الهيدروميتانولية التي أظهرت مستويات سمية ضئيلة عند تركيز 200 مغ/مل، في حين أظهر جزء أسيتات الإيثيل للمستخلص الهيدروميتانولي للنبتين قدرة عالية في إرجاع الجذور الحرة، في إرجاع الحديد و الزنك، في تثبيط تبيض البيتاكاروتين و كمضاد فعال لإنحلال الدم. كما أظهر جزء أسيتات الإيثيل قوة كبيرة مضادة لإرتباط السكر بالبروتينات و مثبطة لنشاط الإنزيم ألفا أميلاز ($0,11 \pm 16,37 = CI_{50}$ و $0,41 \pm 13,73 = CI_{50}$ ميكروغرام/مل بالنسبة لنبته *M. pulegium* و $1,69 \pm 61,85 = CI_{50}$ ميكروغرام/مل بالنسبة لنبته *S. chamaecyparissus*)، ألفا غلوكوزيداز ($0,05 \pm 3,13 = CI_{50}$ ميكروغرام/مل بالنسبة لنبته *M. pulegium* و $0,16 \pm 15,62 = CI_{50}$ ميكروغرام/مل بالنسبة لنبته *S. chamaecyparissus*) أستيل كولين استيراز ($0,00 \pm 7,82 = CI_{50}$ ميكروغرام/مل بالنسبة لنبته *M. pulegium* و $0,20 \pm 12,97 = CI_{50}$ ميكروغرام/مل بالنسبة لنبته *S. chamaecyparissus*) و بوتيريل كولين استيراز ($0,45 \pm 7,25 = CI_{50}$ ميكروغرام/مل بالنسبة لنبته *M. pulegium* و $0,20 \pm 12,97 = CI_{50}$ ميكروغرام/مل بالنسبة لنبته *S. chamaecyparissus*). هذه الأنشطة أعلى من الأكاربوز و الجالونتامين المستخدمة كأدوية موحدة. كشف التحليل الكروماتوغرافي على وجود حمض غاليك، حمض بي كوماريك، حمض الفيروليك، روتين، كيرسيتين، ونارنجينين في هذا الجزء. تشير هذه النتائج إلى أن *M. pulegium* و *S. chamaecyparissus* مصدر غني بمضادات الأكسدة و التي يمكن أن تكون مفيدة للوقاية و العلاج من الأمراض المرتبطة بالإجهاد التأكسدي بما في ذلك داء السكري و مرض الزهايمر.

الكلمات المفتاحية: *M. pulegium* و *S. chamaecyparissus*، مركبات فينولية، RP-HPLC-PDA، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للدم، نشاط مضاد لمرض السكري، نشاط مضاد لمرض الزهايمر.

Résumé

Mentha pulegium et *Santolina chamaecyparissus* sont deux plantes médicinales, largement utilisées en pharmacopée traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies. Ce travail porte sur l'étude phytochimique et la recherche des activités biologiques des extraits bruts hydrométhanoliques obtenus de la partie aérienne des deux plantes et leurs fractions riches en composés phénoliques (éther diéthylique, acétate d'éthyle et n-butanol). L'analyse du profil phytochimique des fractions riches en composés phénoliques de *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* a été effectuée à l'aide d'une chromatographie liquide à haute performance RP-HPLC-PDA. En outre, le test d'hémolyse a été réalisé *in vitro*, afin d'étudier la toxicité des différents extraits et fractions vis-à-vis des érythrocytes humaines. L'activité antioxydante a été évaluée par différentes méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène et le transfert d'électron singulier : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), [2,2'-azino-bis (acide 3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] (ABTS), radical galvinoxyle (GOR), radical superoxyde, la PAOT-liquide®, la capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC), pouvoir réducteur du fer, phénanthroline, et blanchissement du β -carotène. L'évaluation de l'activité anti-hémolytique a été réalisée par la mise en contact des globules rouges préalablement incubés avec les extraits à différentes concentrations en présence de AAPH (2,2'-azobis(2-aminodipropane, dihydrochloride). Tandis que l'activité antidiabétique des extraits a été étudiée *in vitro* en évaluant leurs pouvoirs inhibiteurs vis-à-vis de l' α -amylase et de l' α -glucosidase. L'évaluation de l'activité antiglycation a été également réalisée. Enfin, l'inhibition de la cholinestérase a été évaluée vis-à-vis de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Les résultats obtenus ont montré que l'ensemble des extraits ne sont pas toxiques vis-à-vis des érythrocytes humaines à l'exception des extraits bruts hydrométhanoliques qui ont présenté une faible toxicité à la concentration de 200 mg/ml. La fraction acétate d'éthyle, la plus riche en composés phénoliques, des deux plantes étudiées, a présenté un potentiel intéressant du piégeage des radicaux libres (DPPH, ABTS, GOR, superoxyde), de réduction du fer et du cuivre, d'inhibition de blanchissement du β -carotène et un effet anti-hémolytique le plus puissant. La fraction acétate d'éthyle a enregistré également la meilleure activité antiglycation et a exercé les activités inhibitrices les plus élevées vis-à-vis de l' α -amylase ($CI_{50} = 16,37 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$ pour *M. pulegium* et $CI_{50} = 13,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ pour *S. chamaecyparissus*) de l' α -glucosidase ($CI_{50} = 61,85 \pm 1,69 \mu\text{g/ml}$ pour *M. pulegium* et $CI_{50} = 15,62 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$ pour *S. chamaecyparissus*), de l'AChE ($CI_{50} = 3,13 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ pour *M. pulegium* et $CI_{50} = 7,82 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$ pour *S. chamaecyparissus*) et de la BChE ($CI_{50} = 12,97 \pm 0,20$ pour *M. pulegium* et $CI_{50} = 7,25 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$ pour *S. chamaecyparissus*). Ces activités sont supérieures à celles de l'Acarbose et de la Galantamine utilisés comme médicaments standard. L'analyse chromatographique a révélé la présence de l'acide gallique, l'acide p-coumarique, l'acide férulique, la rutine, la naringénine et la quercétine dans cette fraction. Ces résultats montrent que *M. pulegium* et *S. chamaecyparissus* constituent une source prometteuse d'antioxydants, qui pourraient être utiles dans la prévention et les thérapies des maladies associées au stress oxydatif, y compris le diabète sucré et la maladie d'Alzheimer.

Mots clés : *M. pulegium*, *S. chamaecyparissus*, composés phénoliques, RP-HPLC-PDA, activité antioxydante, activité anti-hémolytique, activité antidiabétique, activité anti-Alzheimer.

Abstract

Mentha pulegium and *Santolina chamaecyparissus* are two medicinal plants, widely used in traditional pharmacopoeia to treat many diseases. This work focused on the phytochemical study and the search for biological activities of the hydromethanolic crude extracts obtained from the aerial part of the two plants and their fractions rich with phenolic compounds (diethyl ether, ethyl acetate and n-butanol). The analysis of the phytochemical profile of the extracts of *M. pulegium* and *S. chamaecyparissus* was carried out using a high-performance liquid chromatography RP-HPLC-PDA. The *in vitro* hemolytic test was used to measure the toxicity of the different extracts and fractions on human erythrocytes. The antioxidant activity was evaluated by methods based on hydrogen atom transfer and singular electron transfer; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (ABTS), galvinoxyl radical (GOR), superoxide radical, liquid-PAOT®, copper reducing antioxidant capacity (CUPRAC), ferric reducing activity, phenanthroline and β -carotene bleaching. The evaluation of the anti-hemolytic activity was carried out by contacting the human red blood cells with the extracts at different concentrations tested in the presence of AAPH (2,2'-azobis(2-aminodipropane, dihydrochloride). The antidiabetic activity of the extracts was studied *in vitro* by evaluating their ability to inhibit α -amylase and α -glucosidase. The evaluation of the antiglycation was also carried out. Finally, the inhibition of cholinesterase was estimated by two enzymes acetylcholinesterase (ACHE) and butyrylcholinesterase (BChE). The results obtained showed that all the extracts are not toxic to human erythrocytes with the exception of the crude hydromethanolic extracts which showed low toxicity at a concentration of 200mg/ml. The ethyl acetate fraction, the richest in phenolic compounds of the two plants studied, had an interesting potential for trapping free radicals (DPPH, ABTS, GOR, superoxide), reducing iron and copper, β -carotene bleaching inhibition and the most powerful anti-hemolytic effect. The ethyl acetate fraction also recorded the best antiglycation activity and exercised the highest inhibitory activities of α -amylase ($IC_{50} = 16,37 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$ for *M. pulegium* and $IC_{50} = 13,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ for *S. chamaecyparissus*) α -glucosidase ($IC_{50} = 61,85 \pm 1,69 \mu\text{g/ml}$ for *M. pulegium* and $IC_{50} = 15,62 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$ for *S. chamaecyparissus*), AChE ($IC_{50} = 3,13 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ for *M. pulegium* and $IC_{50} = 7,82 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$ for *S. chamaecyparissus*) and of the BChE ($IC_{50} = 12,97 \pm 0,20$ for *M. pulegium* and $IC_{50} = 7,25 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$ for *S. chamaecyparissus*), its activity was higher than that of Acarbose and Galantamine used as standard drugs. Chromatographic analysis revealed the presence of gallic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, rutin, naringenin and quercetin in this fraction. These results show that *M. pulegium* and *S. chamaecyparissus* are a promising source of antioxidants, which could be useful in the prevention and therapies of diseases associated with oxidative stress, including diabetes mellitus and Alzheimer's disease.

Key words: *M. pulegium*, *S. chamaecyparissus*, phenolic compounds, RP-HPLC-PDA, antioxidant activity, anti-hemolytic activity, antidiabetic activity, anti-Alzheimer activity.