

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2018

THÈSE

Présentée par

BOUBEKEUR Hafsa

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

Activités biologiques d'*Helichrysum stoechas*

Soutenue publiquement le 21/02/2019

DEVANT LE JURY

Président	KHENNOUF Seddik	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	BELHATTAB Rachid	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs	DIAFAT Abdelouahab	MCA. UBI. BBA
	BOUANANE Amel	MCA. USTHB
	MENDIL Amina	MCA. USTHB

DEDICADES

A mes parents

A toute la famille

A mes enfants

REMERCIEMENTS

Il m'est agréable de remercier vivement tous ceux qui, grâce à leur aide précieuse, ont permis la réalisation de ce travail.

***Pr. BELHATTAB Rachid** (directeur de thèse) de l'université Ferhat Abbas Sétif 1 pour m'avoir laissé libre de découvrir le monde de la recherche par moi-même. Je lui adresse tout mes sincères remerciements pour ses conseils et ses orientations tout au long de ce travail.*

*Le président **Pr. KHENNOUF Seddik** et les membres du jury, **Dr MENDIL Amina**, **Dr BOUANANE Amel**, **Dr DIAFAT Abdelouahab** pour avoir pris le temps de lire et juger cette thèse, pour leurs remarques avisées et leurs nombreux conseils.*

Je veux aussi remercier tous mes amis (es) et mes collègues qui m'ont aidé, soutenu et supporté tout au long de ce travail.

Et enfin, Je tiens à exprimer toute ma gratitude à ma famille pour son soutien et sa confiance tout au long de ce travail.

SOMMAIRE

	Pages
Introduction	1
Partie I. Synthèse bibliographique	
I.1. Etude pharmacologique	3
I.1.1. Diabète	3
I.1.1.1. Définition du diabète	3
I.1.1.2. Symptômes du diabète	3
I.1.1.3. Types du diabète	4
I.1.1.4. Critères diagnostiques de diabète sucré	4
I.1.1.5. Complications du diabète	4
I.1.1.6. Traitement du diabète	4
I.1.1.7. Phytothérapie antidiabétique	5
I.1.1.7.1. Définition de la phytothérapie	5
I.1.1.7.2. Plantes antidiabétiques	6
I.1.2. L'activité anti-inflammatoire	7
I.1.2.1. L'inflammation	7
I.1.2.2. Mécanismes de l'inflammation	7
I.1.2.3. Les anti-inflammatoires	8
I.1.3. L'activité antioxydante	9
I.1.3.1. Stress oxydatif	9
I.1.3.1.1. Définition	9
I.1.3.1.2. Les radicaux libres	9
I.1.3.1.3. Les conséquences du stress oxydatif	11
I.1.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	12
I.1.3.3. Les antioxydants	13
I.2. Généralité sur la plante	15
I.2.1. Caractère généraux des <i>Asteraceae</i>	15
I.2.2. Classification et description botanique de <i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench	16
I.2.3. Caractérisation chimique de l'espèce <i>H. stoechas</i>	17
I.2.4. L'utilisation traditionnelle de <i>Helichrysum</i>	19
Partie II. Matériels et méthodes	
II.1. Récolte et préparation du matériel végétal	21
II.2. Etude phytochimique	22
II.2.1 Préparations des extraits végétaux	22
II.2.1.1 Extraction à froid	22
II.2.1.2 Extraction à chaud	22
II.2.2. Analyses qualitatives et quantitatives des extraits de plantes	23
II.3. Activités biologiques des extraits	27
II.3.1. Les activités antioxydantes	27
II.3.1.1. La méthode de piégeage du radical libre DPPH'	28
II.3.1.2. La méthode de réduction du fer (FRAP)	29
II.3.1.3. Évaluation de la capacité antioxydante totale	30
II.3.1.4. Activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène	31
II.3.2. Activité antimicrobienne	31
II.3.2.2. Technique de diffusion en gélose par puits	32
II.3.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	32

II.3.3. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	34
II.3.3.3. Hémolyse induite par hypotonie	35
II.3.3.4. Hémolyse induite par chaleur	35
II.3.3.5. Méthodes de dénaturation de l'albumine	36
II.3.4. Evaluation de la toxicité et de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	36
II.3.4.2. Le test de toxicité	36
II.3.4.3. Protocole expérimental de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	37
II.3.5. Évaluation de l'effet analgésique	40
II.3.5.1. Évaluation de l'effet analgésique central	40
II.3.5.2. L'évaluation de l'effet analgésique périphérique (test de torsion)	42
II.3.6. Evaluation de l'activité anti-hyperglycémiant <i>in vitro</i>	44
II.3.6.1. L'effet de l'extrait aqueux d' <i>H. stoechas</i> sur l'activité d' α -amylase	44
II.3.6.2. L'effet des extraits aqueux sur l'absorption de glucose par la levure	46
II.3.6.3. La glycosylation non enzymatique	48
II.3.6.3.3. Détermination des conditions pour la glycosylation de l'hémoglobine	49
II.3.6.3.4. L'effet des extraits aqueux sur la glycosylation d'hémoglobine	49
II.3.7. Evaluation de l'activité anti-hyperglycémiant <i>in vivo</i>	50
II.3.7.4. L'étude à court terme chez les souris non diabétiques	51
II.3.7.4.1. L'essai chez les souris normo-glycémiques	51
II.3.7.4.2. Test de tolérance orale au glucose (TTOG)	51
II.3.7.5. Induction du diabète chez les souris	51
II.3.7.5.1. l'étude à court terme chez les souris diabétiques	52
II.3.7.5.2. L'étude à long terme	52
Partie III. Résultats et discussions	
III.1. Les rendements des extractions	54
III.2. Criblage phytochimique	54
III.3. Analyses quantitatives de polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins	56
III.4. Activité antioxydante	59
III.4.5. Corrélation entre les composés phénoliques, les flavonoïdes, tanins et les activités antioxydantes.	64
III.5. Activité antimicrobienne	65
III.6. Discussion	68
III.7. Activité antidiabétique <i>in vitro</i>	72
III.8. Activité anti-hyperglycémiant <i>in vivo</i> de l'extrait aqueux décocté	82
III.9. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	93
III.10. Détermination de l'activité antalgique, anti-inflammatoire <i>in vivo</i> de l'extrait éthanolique	98
Conclusion	109
Références bibliographiques	111
Annexes	134
Productions scientifiques	

LISTE DES ABREVIATIONS

Abs	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
AChE	Acetylcholinesterase
ADA	American Diabetes Association
AIS	anti-Inflammatoires Stéroïdiens
ANOVA	Analyse de la variance
AqD	Extrait aqueux obtenu par décoction
AqM	Extrait aqueux obtenu par macération
ARN	Acide ribonucléique
CAT	Capacité antioxydante totale
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DL ₅₀	Dose létale 50
DMSO	Dimethyl Sulfoxyde
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4
DPPH	2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle
EAT	équivalents de l'acide tannique
EPP	Ethyl Phenyl Propiolate)
EOA	Epèces Oxygénées Activées
EQ	Equivalents de quercétine
EtOH _(D)	Extrait ethanolique obtenu par décoction
EtOH _(S)	Extrait ethanolique obtenu par soxhelet
FRAP	(Ferric Reducing Antioxidant Power),
GP	Glutathion peroxydase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HCl	Acide chlorhydrique
HeLa	lignée cellulaire cancéreuse
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSME	extrait méthanolique de <i>H. stoechas</i>

IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration
INT	p-Iodonitrotétrazolium
IL- 1	Interleukine 1
NaCl	Chlorure de sodium
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NADPH,H ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit.
NO	Monoxyde d'azote
O ₂ •-	Anion superoxyde.
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONAB	Office National des Aliment de Bétails
PBS	Phosphate Buffered Saline
PLA ₂	Phospholipase A ₂
Rf	Facteurs de rétentions
RLO	Radicaux Libres Oxygénés
SNC	Système Nerveux Central
SOD	Superoxyde dismutase
MS	Mass Spectrometry
TNF α	Tumor Necrosis Factor- α
TPA	12-O-TetradecanoylPhorbol -13-Acetate
TTOG	Test de tolérance orale au glucose
TYR	Tyrosinase
UFC	Unité Formant Colonie
α -GLU	α -Glucosidase

LISTES DES FIGURES

	Pages
Figure.1 : Métabolisme de l'acide arachidonique et synthèse des prostaglandines	8
Figure.2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	10
Figure.3 : Spectre de différentes pathologies touchant divers organes dans lesquelles le stress oxydant est impliqué	12
Figure.4 : Les structures chimiques des composés phénoliques présents dans <i>Helichrysum stoechas</i>	18
Figure.5 : <i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench	21
Figure.6 : Mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le DPPH*	28
Figure.7 : (a) : Injection sub-plantaire de l'Agar-Agar, (b) : Patte après l'injection, (c) : Administration orale des extraits	39
Figure.8 : Mesure du volume de gonflement de la patte manuellement à l'aide d'un réservoir contenant l'eau distillée	39
Figure.9 : Immersion de l'extrémité inférieure de la queue dans un bain d'eau à 55 °C	42
Figure.10 : (a et b) : Etirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale, (c) : Absence de torsion	43
Figure.11 : Activité anti-hyperglycémique <i>in vitro</i> par test d'amidon-iodure	46
Figure.12 : L'absorption de glucose par la levure	47
Figure.13 : Glycosylation d'hémoglobine	48
Figure.14 : (a) : prélèvement de sang caudale, (b) : Glucomètre, (c) : balance en gramme (g)	53
Figure.15 : Evaluation des polyphénols totaux, flavonoïdes et les tannins des différents extraits de <i>H. stoechas</i>	58
Figure.16 : Les valeurs IC ₅₀ (µg / ml) pour les extraits de <i>Helichrysum stoechas</i> et les standards déterminées par le test DPPH et la méthode du piégeage du peroxyde d'hydrogène. Tous les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne ± SEM (<i>n</i> = 3)	60
Figure.17 : Activité antiradicalaire testé par la méthode FRAP pour les extraits de <i>Helichrysum stoechas</i> et les standards	62
Figure.18 : La capacité antioxydante totale des extraits et les composés de références (acide gallique et BHT)	63
Figure.19 : Comparaison de l'activité antimicrobienne des standards, et les extraits hydro-alcooliques et aqueux à 150mg/ml de <i>H. stoechas</i> obtenus par macération, décoction et soxhlet	66
Figure.20 : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits de <i>H. stoechas</i>	68
Figure.21 : Pourcentage d'inhibition (%) de l'α-amylase par les extraits aqueux de <i>H. stoechas</i> et le standard, metformine	74
Figure.22 : Absorption du glucose à 5 mM en fonction de la concentration de l'extrait de <i>H. stoechas</i>	78
Figure.23 : Absorption du glucose à 10 mM en fonction de la concentration de	79

l'extrait de <i>H. stoechas</i>	
Figure.24 : Absorption du glucose à 20 mM en fonction de la concentration de l'extrait de <i>H. stoechas</i>	79
Figure.25 : Effet des extraits de <i>H. stoechas</i> sur l'inhibition de la glycosylation de l'hémoglobine	81
Figure.26 : Evolution de la glycémie chez les souris normales soumis au traitement à courte terme aux différents extraits aqueux de <i>H. stoechas</i> durant 4 heures	84
Figure. 27 : Variations de la glycémie chez les souris normales traités par l'extrait aqueux de <i>H stoechas</i> à différentes concentrations et soumises à un test de tolérance orale au glucose	85
Figure.28 : Variations de la glycémie à courtes termes chez les souris rendues diabétique par alloxane et traitées par l'extrait aqueux de <i>H stoechas</i> à différentes concentrations et la metformine. Chaque point représente la moyenne \pm SEM (n= 3)	88
Figure.29 : Evolution du poids corporel en (g) chez les souris diabétiques (témoins et expérimentaux) soumis à l'administration orale de différentes doses d'extrait aqueux durant 10 jours	90
Figure.30 : Effet de l'extrait de <i>H. stoechas</i> sur la stabilisation membranaire des hématies et dénaturation d'albumine	94
Figure.31 : Effet de diclofenac de sodium sur la stabilisation membranaire des hématies et dénaturation d'albumine	95
Figure.32 : Détermination des valeurs d'IC ₅₀ de l'extrait éthanolique d' <i>H. stoechas</i> et du diclofenac de sodium par différentes méthodes anti-inflammatoires	96
Figure.33 : Evolution de l'œdème (m \pm SEM) en présence d'un traitement de l'extrait éthanolique et diclofenac et leur mélange par voie orale, après l'injection de 2% d'agar, n= 4 souris	100
Figure.34 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème des pattes des souris, induit par 2% d'agar, après les différents traitements lors du test de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique en comparaison à la référence diclofenac (Dic)	101
Figure.35 : Temps de réponse des souris aux extraits éthanoliques, paracetamole + codeine et leur combinaison à différents intervalles de temps par la méthode d'immersion de la queue des souris, (n=4)	102
Figure.36 : l'effet de l'extrait éthanolique, le Paracétamol +codein et leur combinaison sur les souris déterminé par la méthode de la plaque chauffante	104
Figure.37 : Action analgésique périphérique de l'extrait éthanolique et diclofenec et leur combinaison administrée par voie orale chez les souris	105
Figure 38. Pourcentage de protection de l'extrait éthanolique et diclofenec et leur combinaison sur les crampes induites par l'acide acétique chez les souris	106

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau.1 : Quelques antidiabétiques oraux utilisés dans le traitement du diabète type 2	6
Tableau.2 : Quelques plantes antidiabétiques référenciées	7
Tableau.3 : Le rendement de différents extraits de <i>Helichrysum stoechas</i>	54
Tableau.4 : Criblage phytochimique de l'extrait de <i>Helichrysum stoechas</i> (réactions en tube)	55
Tableau.5 : Valeurs des Rf des échantillons de différents extraits de <i>Helichrysum stoechas</i> et les temoins	56
Tableau.6 : Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tannins	57
Tableau.7 : La détermination de IC ₅₀ des activités antiradicalaires et antioxydantes des différents extraits de <i>H. stoechas</i> et les standards	59
Tableau.8 : Activité antiradicale des extraits de l' <i>Helichrysum.stoechas</i> et l'acide ascorbique	61
Tableau.9 : Corrélation entre polyphénols, flavonoïdes, tanins des extraits et leurs activités antioxydantes	64
Tableau.10 : Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne par les différents extraits de <i>H. stoechas</i> et les contrôles	65
Tableau.11 : Activité microbicides des extraits et standards	67
Tableau.12 : Inhibition de l'activité α -amylase par les extraits aqueux de <i>H. stoechas</i> et la metformine	74
Tableau.13 : Effet de l'extrait aqueux de <i>H. stoechas</i> et le standard (la metformine) sur l'absorption de glucose (5mM) par les cellules de levure	77
Tableau.14 : Effet de l'extrait aqueux de <i>H. stoechas</i> et le standard (la metformine) sur l'absorption de glucose (10mM) par les cellules de levure	77
Tableau.15 : Effets de l'extrait aqueux de <i>H. stoechas</i> et le standard (la metformine) sur l'absorption de glucose (20mM) par les cellules de levure	77
Tableau.16 : Effet de la concentration du glucose et de la durée d'exposition sur la glycosylation de l'hémoglobine	80
Tableau.17 : Effets des extraits aqueux et du standard (la metformine) sur la glycosylation non enzymatique de l'hémoglobine	81
Tableau.18 : Evolution de la valeur moyenne de la glycémie des souris en fonction du traitement à courte terme aux différents extraits aqueux, standard et leur combinaison	83
Tableau.19 : Effets de l'extrait aqueux décocté (Ext aq HS), standard et leur combinaison sur le taux de glucose sanguin des souris normo-glycémique soumises à un test de tolérance orale au glucose (TTOG)	85
Tableau.20 : L'effet anti-hyperglycémique de l'extrait aqueux décocté (Ext aq HS), la metformine et leur combinaison chez les souris normo-glycémiques traitées à long terme	86
Tableau.21 : L'effet de l'extrait aqueux décocté (Ext aq HS), standard et leur combinaison sur les niveaux de glucose sanguin (mg/dl) chez les souris diabétiques induites par l'alloxane à courte terme	87
Tableau.22 : L'effet de l'extrait aqueux décocté (Ext aq HS), standard et leur combinaison sur les niveaux de glucose sanguin (mg/dl) chez les souris diabétiques	89

induites par l'alloxane à long terme	
Tableau.23 : L'effet de l'extrait aqueux décocté (Ext aq HS), standard et leur combinaison sur le poids corporel chez les souris diabétiques induites par l'alloxane	90
Tableau.24 : Effet de l'extrait éthanolique de <i>H. stoechas</i> et de diclofenac sodique sur la lyse membranaire des hématies induite par une solution hypotonique	93
Tableau.25 : Effet de l'extrait éthanolique de <i>H. stoechas</i> et de diclofenac sodique sur la lyse membranaire des hématies induite par la chaleur	94
Tableau.26 : Effet d'extrait éthanolique de <i>H. stoechas</i> et de diclofenac sodique sur la dénaturation des protéines (albumine sérique bovine)	95
Tableau.27 : Le taux de mortalité des souris en fonction de la dose de l'extrait éthanolique administrée	98
Tableau.28 : Variation des volumes moyens et le pourcentage d'inhibition des pattes de souris traitées avec diclofenac, extrait éthanolique et leur combinaison	99
Tableau.29 : Influence de l'extrait éthanolique, le Paracétamol +codeine et leur combinaison vis-à-vis de la douleur induite par la chaleur (le test de l'immersion de la queue des souris)	102
Tableau.30 : Détermination de l'effet de l'extrait éthanolique, le Paracétamol +codeine et leur combinaison sur les souris par le test de la plaque chauffante	103
Tableau 31. Influence de l'extrait éthanolique et diclofenec et leur combinaison sur le nombre de crampes abdominales induites par l'acide acétique chez les souris (Test de Koster)	105

LISTE DES ANNEXES

	pages
Annexe.1	134
Figure.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	134
Figure.2 : Courbe d'étalonnage de la quercetine	134
Figure.3 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique	135
Annexe.2	135
Tableau.1 : Activité antiradicale des extraits de l' <i>Helichrysum stoechas</i> et l'acide	135
Figure.4 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de différents extraits et le standard (BHT)	136
Tableau.2 : Détermination de l'activité antioxydante des extraits ethanologique, aqueux et acide ascorbique par peroxyde d'hydrogène	136
Figure.5 : Pourcentage d'inhibition du H ₂ O ₂ en fonction des concentrations de différents extraits et le standard (Acide ascorbique)	137
Figure. 6 : Courbe d'étalonnage de l'activité antioxydante par phosphomolybdate d'ammonium	137
Figure.7 :.Corrélation entre polyphénols, flavonoïdes, tanins des extraits et l'activité antioxydante, (a) : essai de DPPH, (b) H ₂ O ₂ , (c) au molybdate et (d) au Frap	139

Introduction

Les plantes médicinales contribuent de manière significative au bien être des populations, ce qui a suscité l'intérêt de différents acteurs émanant de différents secteurs à savoir médecine, commerce, écologistes...etc. Outre les tradipraticiens qui les prescrivent ou les recommandent pour le traitement de pathologies bénignes voire même incurables, une partie de la population se trouve impliqué dans la culture, la collecte, le conditionnement, le commerce et l'utilisation de ces plantes.

Les plantes médicinales ont été utilisées pendant des siècles comme remède aux différentes affections que les populations peuvent encourir, des études indiquent que 70 à 80% des habitants de la planète utilisent des plantes médicinales à des fins thérapeutiques (Sobiecki, 2014). D'ailleurs, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 4000 sont des plantes médicinales, ce qui constitue 60 % de la médecine traditionnelle en Afrique (Lhuillier, 2007).

L'Algérie, de sa position géographique, présente une large gamme d'étages bioclimatiques, induisant une biodiversité de plantes utilisées comme condiments, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. La phytothérapie est utilisée depuis toujours dans le secteur de la médecine traditionnelle. Les pharmacopées régionales s'inspirent principalement de la médecine arabe classique et de l'expérience locale des populations en matière de soins. Aujourd'hui les plantes jouent encore un rôle très important dans les traditions thérapeutiques et la vie des habitants, mais les règles de leur utilisation manquent parfois de rigueur et ne tiennent pas compte des nouvelles exigences de la thérapeutique moderne. Ces dernières années, beaucoup de recherches se sont orientés vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de vérifier la sûreté et l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour l'usage de ces plantes. En effet, plusieurs molécules isolées des plantes sont devenues des médicaments efficaces. Il a été estimé que les principes actifs provenant des végétaux représentent 25% des médicaments prescrits soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes (Hostettmann et Wolfender, 2001).

Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail de recherche dont l'objectif essentiel consiste à évaluer les activités biologiques des extraits des parties aériennes d'*Helichrysum stoechas*, plante médicinale de la famille des Asteracées, connue en Algérie sous le nom Zeheur ed daime. Cette plante est réputée pour ses diverses vertus, elle est utilisée comme anti-

asthmatique, diurétique, lithagogue et pour traiter diverses affections notamment, l'anémie, les plaies, les spasmes (Lourans *et al.*, 2008 ; Onaran *et al.*, 2016).

Dans le souci de valoriser la flore algérienne et en vue de substituer les molécules chimiques à visées thérapeutiques ou industrielles par des molécules naturelles sans effets adverses, ce travail s'inscrit dans cette optique.

Cette investigation tend à caractériser les différents groupes chimiques dominant les extraits de *H. stoechas* et l'évaluation des activités antioxydantes, antifongiques, antibactériennes, anti-inflammatoires et anti diabétiques.

La présente thèse est structurée en trois parties :

La première consiste en une synthèse bibliographique relatant des généralités sur la plante et les propriétés pharmacologiques des plantes médicinales en général.

La deuxième partie est une étude expérimentale, elle-même présentée sous deux volets :

Le premier comporte les méthodes d'extractions et le deuxième décrivant les tests biologiques entrepris à savoir : criblage photochimique, dosage des polyphénols, des flavonoïdes et tannins, l'évaluation de l'activité antioxydante, antimicrobienne de différents extraits, l'activité antalgique et anti inflammatoire *in vivo* et *in vitro* de l'extrait éthanolique, et en fin l'activité antidiabétique *in vivo* et *in vitro* de l'extrait aqueux.

La troisième partie représente les résultats et discussion suivie d'une conclusion générale.

Partie I. Synthèse bibliographique

I.1. Etude pharmacologique

I.1.1. Diabète

I.1.1.1. Définition du diabète

Le diabète sucré est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de la sécrétion de l'insuline ou de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (Goldenberg et Punthakee, 2013).

I.1.1.2. Symptômes du diabète

Les symptômes classiques sont une polyurie, une polydipsie et une perte de poids. Ils peuvent être même inexistantes au début et le diagnostic ne sera posé que plusieurs années après l'apparition de la maladie.

I.1.1.3. Types du diabète

I.1.1.3.1. Le diabète de type 1

Insulinodépendant, est une affection auto-immune, caractérisée par la destruction des cellules β du pancréas. Le manque d'insuline qui en découle rend l'administration de cette hormone indispensable. Cette affection apparaît généralement pendant la jeunesse et le diagnostic est souvent posé suite à la présence de symptômes sévères. L'insulinothérapie est indispensable à la vie (Punthakee *et al.*, 2018).

I.1.1.3.2. Le diabète de type 2

Non insulinodépendant, apparaît d'une part suite à une résistance à l'insuline des tissus périphériques (insulinorésistance) d'autre part, les cellules sont encore capables de produire de l'insuline mais elles ne parviennent pas à compenser la résistance à l'insuline (Punthakee *et al.*, 2018). Il représente environ 90% à 95% de tous les cas diabétiques où le facteur génétique et les facteurs d'environnement sont étroitement associés (Benhadou Andaloussi, 2009)

I.1.1.3.3. Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est défini par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et l'ADA (American Diabetes Association) comme tout degré d'intolérance glucidique ayant débuté ou ayant été mis en évidence pour la première fois durant la grossesse (Pirson *et al.*, 2016).

I.1.1.3.4. Le diabète secondaire

Dans laquelle une autre maladie est à la base de l'apparition du diabète. Les causes les plus fréquentes de diabète secondaire sont les suivantes:

- ✓ Affections du pancréas,
- ✓ Affections métaboliques,
- ✓ Affections endocriniennes
- ✓ Utilisation des médicaments diabétoènes.
- ✓ Syndromes génétiques (syndrome de Down, ataxie de Friedreich)
- ✓ Infections virales (rubéole congénitale, cytomégaloovirus) (Bastiaens *et al.*, 2013)

I.1.1.4. Critères diagnostiques de diabète sucré

Le diagnostic de diabète peut être établi de trois façons différentes, qui, en l'absence d'une hyperglycémie évidente devront être confirmées par une deuxième mesure :

- ✓ symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement inexpliqué, somnolence voire coma) et glycémie quelle que soit l'heure $\geq 2,00$ g/L (11,1 mmol/L),
- ✓ glycémie à jeun $\geq 1,26$ g/L (7,00 mmol/L),
- ✓ glycémie 2 h après une charge de 75 g de glucose lors d'une hyperglycémie provoquée par voie orale $\geq 2,00$ g/L (11,1 mmol/L). (Drouin *et al.*, 1999)

I.1.1.5. Complications du diabète

La gravité du diabète provient essentiellement de ses complications à long terme, source d'handicaps pouvant altérer la qualité de vie et générer de lourdes dépenses de santé.

Les complications les plus importantes sont :

- ✓ La rétinopathie, une cause importante de cécité et de malvoyance.
- ✓ La néphropathie, anomalie rénale qui apparait chez tous les diabétiques, peut conduire à l'urémie (insuffisance rénale) et à la mort.
- ✓ La neuropathie diabétique, qui touche le système nerveux périphérique et le système autonome, la plus fréquente et la plus précoce des complications du diabète.
- ✓ Les complications métaboliques qui comprennent l'acidocétose, le coma et l'acidose lactique
- ✓ risque d'infection ainsi que d'anomalies articulaires et dermatologiques (Orban et Ichai, 2008 ; Wherrett *et al.*, 2013)

I.1.1.6. Traitement du diabète

Le but de la thérapie antidiabétique est la stabilisation du taux de glucose sanguin à un taux le plus proche de la normal et de prévenir l'apparition des complications de cette pathologie. L'activité physique et la surveillance de l'alimentation font partie intégrante du traitement du diabète.

Le contrôle et la surveillance des facteurs de risque comme par exemple, le surpoids, le tabagisme, l'excès de cholestérol et la consommation d'alcool sont également indispensables.

- ✓ Faire du sport et adopter une activité physique régulière: marche, natation, vélo
- ✓ Contrôler le poids.
- ✓ Surveiller l'alimentation.
- ✓ Traiter l'hypertension artérielle.
- ✓ Arrêt du tabac.
- ✓ Diminuer l'alcool.
- ✓ La prévention des infections urinaires, des infections de la peau.
- ✓ La surveillance de l'état de ses pieds.
- ✓ Traiter l'hyperlipidémie si elle n'a pas été corrigée par la perte de poids

Le traitement par insuline est nécessaire pour la survie des diabétiques de type 1. Les diabétiques de type 2 peuvent être traités par des mesures hygiéno-diététiques (régime et activités physiques) qui peuvent être associées à des antidiabétiques oraux ou encore à de l'insuline (Tab.1) (Pichetti *et al.*, 2013 ; Sigal *et al.*, 2013).

A ce jour, plus de 10000 espèces de plantes différentes sont utilisées à des fins thérapeutiques, et de nombreux médicaments sont élaborés à partir de leurs principes actifs (Dellile, 2007), ces derniers sont assimilables par l'organisme et agissent de manière plus ou moins efficaces, selon leurs dosage et leurs modes de préparation. Il existe plus de 800 plantes utilisées pour combattre le diabète ou ses principaux symptômes (Benhadou Andaloussi, 2009).

I.1.1.7. Phytothérapie antidiabétique

I.1.1.7.1. Définition de la phytothérapie

La phytothérapie du grec « *phyton* », plantes et « *therapein* », soigner signifie donc le fait de soigner par les plantes. Elle désigne la médecine fondée sur les principes actifs végétaux et qui consiste en l'usage des plantes à titre thérapeutique, sous diverses formes galéniques. La phytothérapie est actuellement classée parmi les médecines dites alternatives, sous-entendu alternative à la médecine conventionnelle. (Niel, 2016)

La phytothérapie antidiabétique connaît à ce jour un essor important du fait de la découverte de plus en plus des plantes efficaces dans le traitement du diabète, elle offre une opportunité pour trouver des molécules naturelles susceptibles d'exercer des effets bénéfiques sur la régulation du métabolisme glucidique en évitant les effets secondaires des substances synthétiques (Eddouks *et al.*, 2007).

Tableau. 1 : Quelques antidiabétiques oraux utilisés dans le traitement du diabète type 2 (Pichetti *et al.*, 2013)

Classe	Principe actif	Spécialités	Dosage (mg/g)	Dose/j mini maxi (mg/g)	Nbre prises/jour
Biguanide	metformine*	Glucophage®	Cp à 500 Cp à 850 Cp à 1000 Cp sécable à 700	500- 3000	1 à 3
		Stagid®			
Glitazones	pioglitazone	Actos®	Cp à 15 Cp à 30	15 – 45	1
	rosiglitazone	Avandia®	Cp à 2 Cp à 4 Cp à 8	2 -8	1-2
Sulfamides	Glimepiride	Amarel®	cp à 1 cp à 2 cp à 3 cp à 4	1 - 6	1
Inhibiteurs des α -glucosidases	acarbose	Glucor®	Cp à 50 Cp à 100	150-600	3 (avant chaque repas)
	miglitol	Diastabol®	Cp à 50 Cp à 100	150-300	3 (avant chaque repas)
Glinides	Repaglinide	Novonorm®	cp 0,5 cp 1 et 2	0,5 - 16	2 à 3 (avant chaque repas)

L'évaluation de l'effet antidiabétique de plantes médicinales et la recherche de principes actifs est une voie prometteuse de découverte de nouveaux produits antidiabétiques. Il s'agit des glycanes, de certains terpènes, des sulfites, des polysaccharides, des huiles, des vitamines, des alcaloïdes, des saponines et d'autres composés. L'action hypoglycémiant des plantes peut s'effectuer selon plusieurs mécanismes. Parmi ceux-ci, les chercheurs ont entre autres identifié la stimulation de l'insulino-sécrétion, l'inhibition du glucagon ou d'une autre hormone hyperglycémiant et de l'amplification de l'action de l'insuline au niveau de certaines réactions clés de la glycolyse et de la glycogénogénèse (Benhadou Andaloussi, 2009).

I.1.1.7.2. Plantes antidiabétiques

Les plantes sont toujours une source inépuisable de nouvelles substances à potentialité thérapeutique d'où l'utilisation de leurs extraits comme une pratique courante en médecine traditionnelle. Plusieurs familles possèdent des espèces dont l'activité antidiabétique a été prouvée (Tab.2) (Bnouham *et al.*, 2002). La majorité des médicaments actuels sont d'origine

végétale (extraits) ou bien sont fabriqués à partir de leur modèle par une synthèse chimique des principes actifs.

Tableau.2: Exemple de plantes antidiabétiques (Bnouham *et al.*, 2002).

Famille	Noms scientifiques	Préparation	Composition
Lamiaceae	<i>Marrubium vulgare</i> L. <i>Ajuga reptans</i> (L.) Schreb <i>Lavandula dentata</i> L., 1753 <i>Mentha pulegium</i> L., 1753 <i>Origanum compactum</i> Benth. <i>Rosmarinus officinalis</i> L., 1753 <i>Salvia officinalis</i> L	- Infusion Décoction Poudre	Terpènes et flavonoïdes
Asteraceae	<i>Artemisia herba-alba</i> Asso, 1779 <i>Artemisia absinthium</i> L., 1753 <i>Inula viscosa</i> (L.) Aiton <i>Artemisia vulgaris</i> L.	Poudre Infusion Décoction	Sesquiterpènes et flavonoïdes
Apiaceae	<i>Daucus carota</i> L., 1753 <i>Ammi visnaga</i> (L.) Lam <i>Ferula communis</i> L., 1753 <i>Coriandrum sativum</i> L <i>Foeniculum vulgare</i> Mill	Décoction Infusion	Coumarines, flavonoïdes, huiles essentielles, acides phénoliques Sesquiterpènes et stéroïdes
Fabaceae	<i>Cassia tomentosa</i> L.f. <i>Lysiloma acapulcensis</i> (Kunth) Benth. <i>Trigonella foenum-graecum</i> L	Infusion Décoction Macération	Stéroïdes et tannins
Amaranthaceae	<i>Beta vulgaris</i> L., 1753 <i>Chenopodium ambrosioides</i> L <i>Chenopodium glaucum</i> L	Infusion	Alcaloïdes et flavonoïdes
Zygophyllaceae	<i>Guaicum conlteri</i> A. Gray <i>Peganum harmala</i> L <i>Larrea tridentata</i> (Sessé et Moc. ex DC.) Coville,	Infusion Poudre	Alcaloïdes, terpènes et lignines

I.1.2. L'activité anti-inflammatoire

I.1.2.1. L'inflammation

L'inflammation est un processus normal et complexe qui se produit en réponse à des agressions physiques (choc thermique), chimiques ou infectieuses. (Rahmani *et al.*, 2016). Le plus souvent cette réaction est bénéfique pour l'organisme agressé. Elle met en jeu de nombreux systèmes biologiques qui visent à détruire ou à éliminer la substance étrangère. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène et de sa persistance. Elle est accompagnée de douleur, rougeur, chaleur, une augmentation de la perméabilité vasculaire, la dénaturation des protéines et la destruction des membranes cellulaires (Ashley *et al.*, 2012).

I.1.2.2. Mécanismes de l'inflammation

Trois phases complexes composent la réponse inflammatoire : Une phase d'initiation qui fait suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène et qui met en jeu des effecteurs primaires (l'histamine, la sérotonine, les kinines, les prostaglandines). Une phase d'amplification avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires (polynucléaires, macrophages). Une phase de résolution et de réparation qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé (Roussel *et al.*, 2005).

I.1.2.3. Les anti-inflammatoires

I.1.2.3.1. Anti-inflammatoire non stéroïdiens

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires et antalgiques. Cependant, leur utilisation thérapeutique à long cours est souvent associée à des effets indésirables tels que les ulcères gastro-intestinaux et l'insuffisance rénale (Ouedraogo *et al.*, 2012).

I.1.2.3.1.1. Mode d'action

L'action des AINS s'explique essentiellement par l'inhibition non spécifique de l'activité des cyclo-oxygénases (COX 1 et COX 2) qui forment la voie principale du métabolisme de l'acide arachidonique en prostaglandine, une molécule instable qui est, à son tour, convertie en de nombreux autres composés inflammatoires (Fig. 1) (Chiolero *et al.*, 2000).

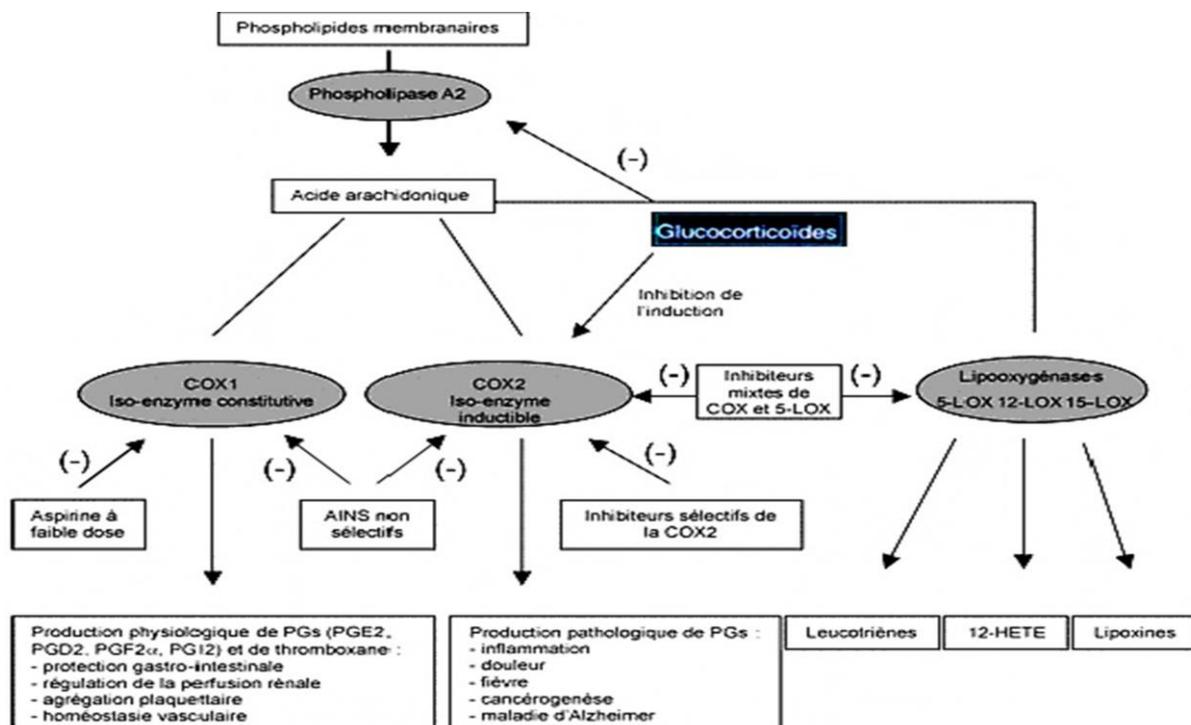


Figure.1 : Métabolisme de l'acide arachidonique et sites d'actions des différents types d'inhibiteurs de cyclo-oxygénase. AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens ; COX : cyclo-oxygénase ; 12HETE : acide 12 hydroxyeicosatétraénoïque ; LOX : lipo-oxygénase ; PGs : prostaglandines (Thieffin, 2003).

I.1.2.3.2. Anti-inflammatoire stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol synthétisé par les glandes surrénales (Baud et Gressens, 2009). Les glucocorticoïdes sont capables d'inhiber toutes les phases de la réaction inflammatoire. Par leur action directe sur les vaisseaux, ils diminuent les phénomènes vasculaires de l'inflammation (Muster, 2005).

I.1.2.3.2.1. Mode d'action

Les glucocorticoïdes traverse la membrane cytoplasmique par diffusion simple et se lie à un récepteur spécifique. Ce complexe récepteur-GC va traverser la membrane nucléaire et, par interaction avec un site receveur nucléaire chromatinien, agir sur l'ADN et modifier l'expression du gène (Muster, 2005). En particulier, inhibent la synthèse de l'IL-1, celle-ci inhibe la phospholipase A2, laquelle fait libérer de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. Ils ont des actions suppressives sur la sécrétion d'autres cytokines proinflammatoires, dont le TNF α (Bonnetblanc *et al.*, 2002).

I.1.3. L'activité antioxydante

I.1.3.1. Stress oxydatif

I.1.3.1.1. Définition

Le stress oxydant est le déséquilibre entre la production des espèces réactives d'oxygène et la capacité des corps à neutraliser et à réparer le dommage oxydatif.

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » (Pincemail *et al.*, 2009).

I.1.3.1.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Ils sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires sur leur couche externe. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir

son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces oxygénées activées (EOA), comme l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH) peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (Fig. 2) (Favier, 2003).

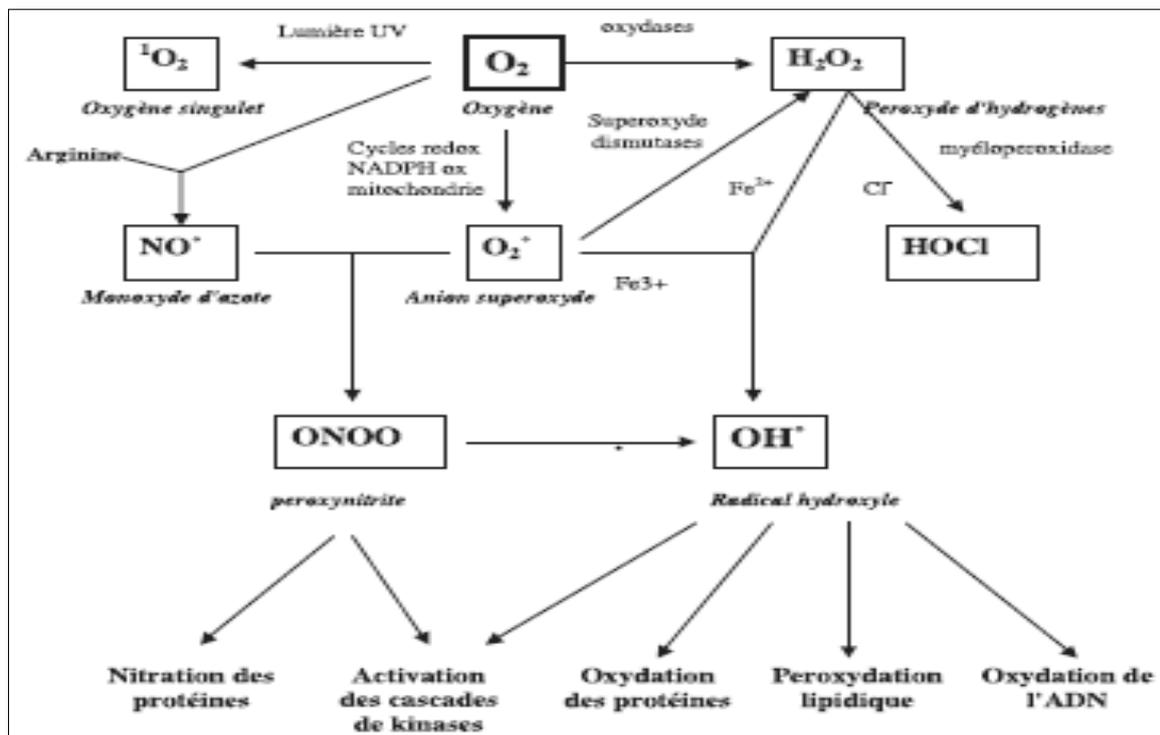


Figure.2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

Les sources métaboliques produisant les radicaux libres oxygénés (RLO) sont nombreuses : cytochromes P-450, activité de la NADPH oxydase, myéloperoxydase, NO synthase, xanthine oxydase. Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes (Afonso *et al.*, 2007).

La production de radicaux libres est donc largement physiologique: elle est déterminée, dirigée, et utile. Parmi les exemples les plus communs, on peut citer la production de superoxyde pendant la phagocytose, et la libération de NO par l'endothélium, qui constitue un des mécanismes de régulation du tonus vasculaire , la production de radicaux libres peut être accidentelle et potentiellement délétère, comme par exemple la fuite d'électrons de la chaîne

respiratoire mitochondriale, ou ceux résultant de l'auto-oxydation des catécholamines (Favier; 2003).

I.1.3.1.3. Les conséquences du stress oxydatif

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides.

Une augmentation du stress oxydant peut entraîner des destructions tissulaires et provoque des lésions au niveau des structures cellulaires. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, le contact avec certains pesticides et les solvants, la consommation de tabac et d'alcool, mauvaise alimentation, phénomènes inflammatoires chroniques ou aigus, la prise de la pilule contraceptive et de certains médicaments, la pratique du sport intensif ou mal géré. Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le vieillissement ou le développement de pathologies associées (maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, cancer) (Haleng *et al.*, 2007).

L'excès de radicaux libres non neutralisé par les défenses est très dommageable pour les macromolécules essentielles de nos cellules, entraînant anomalies d'expression des gènes et des récepteurs membranaires, prolifération ou mort cellulaire, troubles immunitaires, mutagenèse, dépôts de protéines dans les tissus. Dans plusieurs maladies graves, notamment celles liées au vieillissement, le stress oxydant est le facteur déclenchant. C'est le cas des cancers, des pathologies oculaires (cataracte et dégénérescence maculaire), des maladies neuro-dégénératives (ataxies, sclérose latérale, maladie d'Alzheimer). La sclérose latérale amyotrophique familiale est l'exemple le plus démonstratif, puisque cette maladie génétique est due à un défaut sur le gène de l'enzyme antioxydant superoxyde dismutase. Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydant est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires. C'est le cas de maladies infectieuses comme le sida ou le choc septique, l'insuffisance rénale et le diabète (Fig. 3) (Pincemail *et al.*, 2009).

Il est maintenant admis que des concentrations élevées de glucose dans les milieux extra et intra- cellulaires induisent un stress oxydant défini comme un déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant (Favier, 2006).

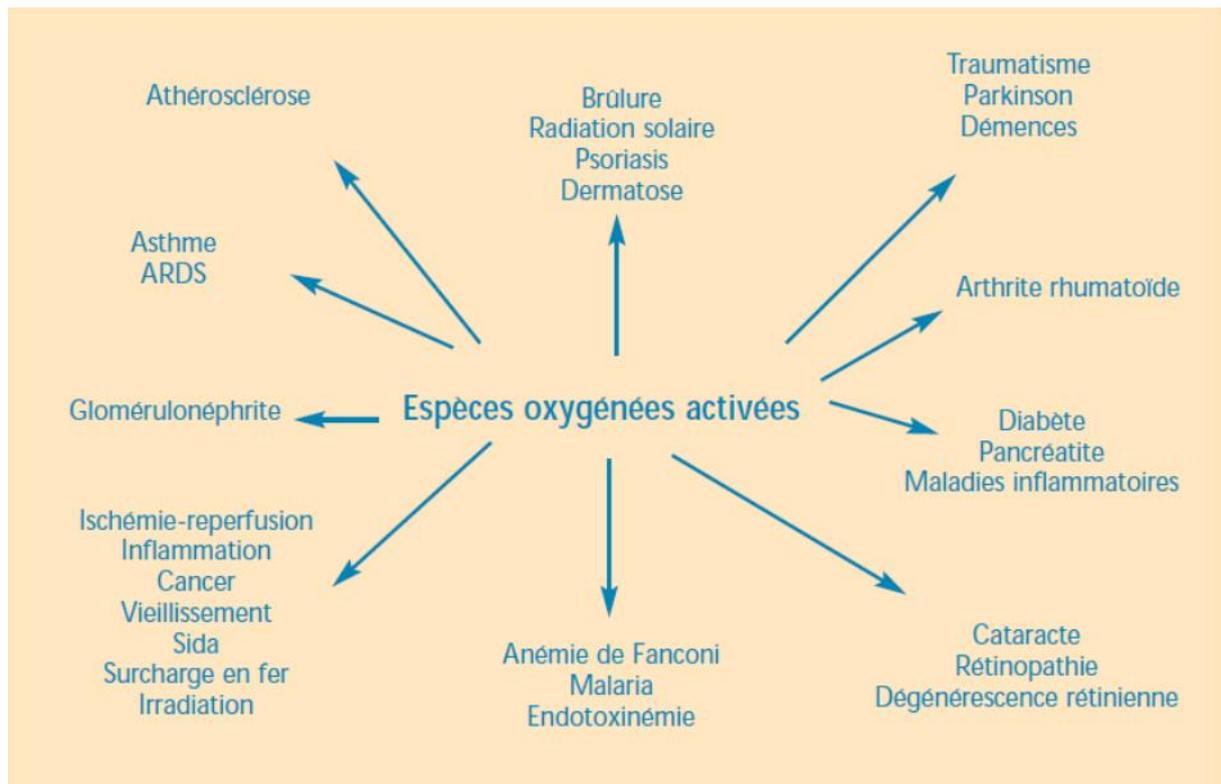


Figure.3 : Spectre de différentes pathologies touchant divers organes dans lesquelles le stress oxydant est impliqué (Pincemail *et al.*, 2009)

Une étude réalisée sur des cellules endothéliales d'origine humaine, montre que des concentrations élevées en glucose augmentent les activités enzymatique antioxydant (superoxyde dismutase, catalase) ainsi que l'expression des ARN de ces enzymes.

Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans le développement d'un stress oxydant en présence de concentration élevée en glucose : l'auto-oxydation du glucose, glycation des protéines et la voie des polyols auto-oxydation du glucose (Auberval, 2010).

I.1.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* ; différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capable d'inhiber la génération de radicaux. Parmi les quelles test DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle), test de l'activité chélatrice des ions de Fe²⁺, test ABTS (Acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), activité réductrice sur le ferricyanure de potassium, test de piégeage du radical hydroxyle•OH, test de la capacité d'inhibition de radical l'anion superoxyde O₂•⁻ et test Phosphomolybdate

(test de PPM) par l'intervention d'une technique d'analyse spectrale (spectroscopie d'absorption UV-Vis notamment

I.1.3.3. Les antioxydants

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène

Pour l'empêcher d'exercer leurs effets délétères. On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule :

- l'une est apportée par l'alimentation via les fruits et légumes, sources de vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, polyphénols ou acide lipoïque.
- l'autre est endogène et se compose de molécules de petite taille (glutathion, acide urique), d'enzymes (SOD, glutathion peroxydase, catalase) ou de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine, protéines de choc thermique, hème oxygénase). A cela s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'activité de certaines enzymes antioxydantes (Favier, 2003 ; Pincemail *et al.*, 2009).

I.1.3.3.1. Les antioxydants endogènes

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GP)

La Superoxyde dismutase est une enzyme localisée dans le cytosol et les mitochondries. Elle a trois co-facteurs : Cu et Zn dans le cytosol, Mn dans les mitochondries. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde (O_2^-).

La SOD transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui est éliminé par la glutathion peroxydase ou la catalase, empêchant ainsi la formation de RLO plus agressifs comme la peroxy-nitrite ou le radical hydroxyle.

La Glutathion peroxydase est localisée dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle dégrade des peroxydes organiques et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et empêche la formation des radicaux libres oxygénés (Afonso *et al.*, 2007).

La catalase est une enzyme héminique essentiellement présente dans les peroxysomes, les érythrocytes, les hépatocytes, le cerveau et les reins (Beaudeau et Geneviève, 2011). Elle est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. C'est l'une des premières enzymes purifiées et cristallisées qui a attiré beaucoup d'attention dans ces dernières années en raison de son lien avec le cancer, le diabète et le vieillissement chez les humains et les animaux (Yang et Poovaiah, 2002 ; Ahuir *et al.*, 2017). D'autres enzymes jouent un rôle non négligeable dans la lutte antioxydante, l'ensemble formant un système complexe: glutaredoxine, thioredoxine reductase et thioredoxine (Mahmood *et al.*, 2013).

I.1.3.3.2. Les antioxydants exogènes

Toutes les défenses de l'organisme peuvent être renforcées par des apports exogènes en :

► Médicaments

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anti-hyperlipoprotéïnémiques, les bêta-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes.

► Les vitamines

a) La vitamine E

La vitamine E ou α -tocophérol, est un antioxydant liposoluble. Leur rôle essentiel est de capter les radicaux peroxydes lipidiques $RO_2\cdot$ qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice. De plus, l' α -tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée $HO_2\cdot$), les radicaux hydroxyles $\cdot OH$, ainsi que l'oxygène singulet 1O_2 .

b) La vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble. L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles $\cdot OH$, mais aussi avec les radicaux superoxydes $O_2\cdot^-$. En outre, l'ascorbate capte les radicaux peroxydes $RO_2\cdot$.

► Antioxydants d'origine végétale

Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de métabolites secondaires, parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercétine. Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot OH$ et peroxydes $RO_2\cdot$. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet 1O_2 , ce

qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire. Les flavonoïdes, leurs activités anti-oxydantes étaient déterminées selon la position et le degré d'hydroxylation.

Les tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

I.2. Généralités sur la plante

I.2. 1. Caractère généraux des *Helichrysum*

Le genre *Helichrysum* est l'un des plus grands genres d'Astéracée, avec environ 600 espèces d'herbes et arbustes largement distribués en Europe (Espagne et le Portugal, Italie, la Corse et la France), en Asie et à travers le continent africain, Madagascar, le bassin Méditerranéen, Macaronésie, (Galbany-Casals *et al.*, 2006), croissant à une large gamme d'altitudes jusqu'à 1700 mètres au-dessus du niveau de la mer, de préférence dans des sols sableux ou limoneux (Perrini *et al.*, 2009).

Leurs fleurs, communément appelées fleurs éternelles, ont été utilisés dans l'antiquité pour faire la couronnes aux idoles de couronne. De nos jours, ils sont populaires pour leurs utilisations ornementales, certaines espèces sont employées en médecine populaire comme expectorant, antipyrétique, antimicrobien, antiviral, diurétique. D'Autres espèces, tels que *H. italicum*, avec un arôme de curry, sont également utilisé en cuisine comme arôme alimentaire (ascensao *et al.*, 2001)

Toutes les espèces ont plusieurs tiges florifères, érigées, ascendantes ou décantées, et feuillu tout au long de leur longueur, plus densément dans la partie basale.

La forme des feuilles peut être linéaire, lancéolé, oblancéolé, ou spatulate. Les bordures des feuilles peuvent être, d'une part, plates ou tournantes, et d'autre part, ondulé.

Les trichomes (les poils) sont présents à l'extérieur des lobes de la corolle, sur la surface abaxiale des feuilles et sur les phyllaries de toutes les espèces, mais de densité variable. Les huiles essentielles contenues dans ce type de trichome rendent ces espèces aromatiques. Les produits sécrétoires s'accumulent dans un espace sous-cutané ou cavité sécrétoire au-dessus de la partie supérieure de cellules apicales.

Dans toutes les espèces, les capitules sont groupés en corymbe terminal synflorescences, qui peuvent être denses à plutôt laxistes et ramifié.

Le réceptacle est nu chez ce genre et généralement plat, bien qu'il puisse parfois être concave ou rarement convexe. La surface peut être lisse, sans aucune alvéole visible, ou alvéolée, avec les alvéoles irrégulièrement dentées, les dents ne dépassant pas l'ovaire en longueur (Ascensão *et al.*, 2001).

En Algérie le genre *Helichrysum* renferme 3 espèces : *H. lacteum* Coss. et Dur., *H. italicum* (Roth.) G. Don et *H. stoechas* (L.) Moench (Quezel et Santa, 1963).

H. lacteum est une plante des clairières, des cédraies, pâturages montagnards. Cette espèce est de répartition géographique rare, elle est rencontrée dans les régions suivantes: Djurdjura, Babors, Aurès. Elle se trouve en Algérie et au Maroc.

H. italicum est une plante des forêts claires, graviers des torrents montagnards. Elle est de répartition très rare : Kenchela, Bibans...etc. Elle est rencontrée en Europe, Australie et en Afrique du Nord.

Helichrysum stoechas : commun sur les coteaux arides.

I.2.2. Classification et description botanique de *Helichrysum stoechas*

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Helichrysum</i>
Espèce	<i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench

Noms en français: Immortelle, Immortelle commune, Immortelle jaune, Immortelle Hyères, Immortelle stoechas (Galbany-Casals *et al.*, 2006).

Nom en arabe: Chernessa, Zeheur ed daime, Chegara, Arfiya, Atsa lalla Fatma (Trabut, 2006).

Helichrysum stoechas est l'un des nombreux membres de la famille des astéracées, cette plante peut être identifiée par une forte odeur de curry lorsque les feuilles ou les tiges sont broyées. La plante communément appelé "Immortelle" le mot "*Helichrysum*" tire son racine de l'hélios en grecque signifie "soleil", et chryos signifie «or». Nommé ainsi pour ses fleurs en forme de boule qui ne se fanent pas. Les fleurs sont petites et poussent en grappes appelées cymes apparaissant au pinnacle de la plante. Immortelle est originaire du centre et du

sud Europe, région méditerranéenne, Afrique du Nord, en Afrique du Sud, en Asie, et en Australie, La Pologne, la Turquie et l'ex-U.S.S.R. cultivé en Italie, en Croatie, en Corse, et en Serbia (Petersen, 2015).

Tout comme la famille des Astéracées, immortelle poussera dans un sol de mauvaise qualité aussi longtemps qu'elle reçoit assez de soleil, bien que la plante préfère sol sableux. Sensible au gel, c'est une plante « héliophile » qui a besoin d'une luminosité importante et « xérophile » qui affectionne les endroits secs ; de fait elle s'adapte aux sols pauvres et secs tels que les garrigues et pelouses rocheuses méditerranéennes. En fait, *Helichrysum stoechas* est une plante vivace aromatique atteignant 0,5 m d'épaisseur sur 1 m de longueur qui forme des touffes. Les fleurs sont hermaphrodites (ont à la fois des organes mâles et femelles) et sont pollinisées par des insectes.

Les feuilles longues de 3-12 mm, les feuilles inférieures sont plus petites arquées-réfléchies, les feuilles supérieures dressées, très serrées, presque imbriquées surtout sur les rejets, linéaires, un peu élargies et assez largement obtuses au sommet, à bords roulés en dessous, blanches-tomenteuses sur les deux faces, ou souvent verdâtres en dessus, lâchement dressées, aiguës ou obtusiuscules au sommet. Ses tiges sont d'aspect laineux et blanchâtre, recouvertes d'un duvet cotonneux comme les feuilles (Fig.5). La floraison s'étale de juin à septembre (Shoby et El-Feky, 2007).

Chez *H. stoechas* les capitules ont largement campanulé et hémisphériques, sont de 4 à 6 mm de diamètre regroupés en corymbes, de couleur jaune doré (Quezel et Santa, 1963 ; Ascensão *et al.*, 2001). Les fleurs se dessèchent persistent sur la plante.

I.2.3. Caractérisation chimique de l'espèce *H. stoechas*

Les parties aériennes de *H. stoechas* contiennent des lactones sesquiterpéniques; chalcones; dérivés et phloroglucinol α -pyrone; dérivés d'acétophénone; les triterpènes comme l'acide ursolique et oléanolique, uvaol et érythrodiol, les bêta-sitostérol et du stigmastérol stérols; acides gras tels que linoléique, palmitique, linoléique, l'acide oléique; l'acide caféique et les flavonoïdes (sous leur forme libre et sous la forme de glycosides), en particulier, l'apigénine, la naringénine, kaempférol, lutéoline, la quercétine, hellicrisina, l'apigénine-7-O-glucoside, kaempférol-3-O-glucoside, la lutéoline-7-O-glycoside et de la quercétine-3-O-glucoside (Fig. 4) (Carini *et al.*, 2001 ; Lavault et Richomme, 2004).

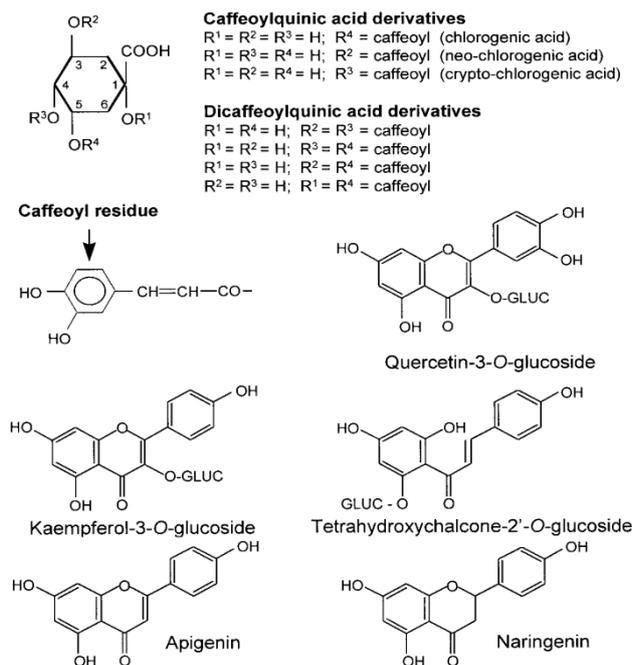


Figure.4: Structures chimiques des composés phénoliques présent dans *Helichrysum stoechas* (Carini *et al.*, 2001).

Rios JL *et al.*, (1991) ont procédé au fractionnement de l'extrait de dichlorométhane des parties aériennes de *Helichrysum stoechas*. Sept composés ont été isolés, qui présentaient divers degrés d'activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives. Ces composés comprennent l'italipyrone, la plicatipyrone, l'hélipyrone, homoarénol, 4,4'-dihydroxy-5,6,5', 6'-tétraméthyl-3,3'-méthylène-di-pyr-2-one et hélipyrone avec un substitution de méthyle.

L'un des principes actifs isolés est le composé gnafaliin, un flavone dont le mécanisme d'action est liée à inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique. Les dérivés 4-hydroxy-3- (3-méthyl-2-butényl) acétophénone et la 4-hydroxy-3- (2-hydroxy-3-isopentényl) acétophénone réduisent l'œdème induit par plusieurs agents irritants et ont des propriétés analgésiques. L'acide ursolique inhibe l'activité de l'élastase dans les leucocytes humains et la libération d'histamine; c'est aussi un inhibiteur sélectif de la cyclo-oxygénase-2.

Sobhy et El-Feky, 2007 ont révélé que l'extrait éthanolique de *H. stoechas* possède les composés (kaempférol, gluconides d'apigénine et dérivés de quinine (acide caffeoylquinique et acide dicaféoylquinique). La quinine est un alcaloïde utilisé pour la prévention et le traitement du paludisme, pour soulager les crampes dans les jambes (Ncube *et al.*, 2008 ; Aiyegoro, 2010).

Les *et al.*, (2017) ont identifié dix constituants principalement de nature phénolique dans l'extrait méthanolique : deux phloroglucinols hétérodimères, arzanol et un composé le (3-[3-

acetyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3,7-diméthyl-2,6-dienyl) phenyl-méthyl]-4-hydroxy-6,5-diméthyl-pyran-2-one), un homodimère α -pyrone, héliopyrone et trois acides phénoliques, acides p-hydroxybenzoïques, acides caféïques et acides néochlorogéniques, un flavonoïde polyméthoxylés et deux flavonoïdes glycosidiques, 5,7-dihydroxy-3,6,8-triméthoxyflavone, isoquercitrine et quercétagine-7-O-glucopyranoside et le santinol B.

I.2.4. L'utilisation traditionnelle de *Helichrysum*

L'utilisation traditionnelle de la fleur éternelle (*Helichrysum stoechas*) pour le traitement des troubles liés au système urinaire a été prouvé dans les maladies urinaires pour prévenir et traiter avec succès les calculs urinaires (Onaran *et al.*, 2016, Orhan *et al.*, 2015). Il a été démontré pour la première fois que les fleurs de *H. stoechas* peuvent agir comme inhibiteurs de l'enzyme du SNC (système nerveux central). L'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE), Tyrosinase (TYR) suggèrent que cette plante peut être comme agent neuroprotecteur (Les *et al.*, 2017). L'inhibition de TYR doit également être prise en compte, car cette enzyme est impliquée dans la pigmentation de la peau par la production de dérivés de la dopaquinone et induction de mélanine; *H. stoechas* est indiqué pour être utilisé dans les produits cosmétiques (Barroso *et al.*, 2014), où l'inhibition de cette enzyme pourrait prévenir la pigmentation de la peau (Solano *et al.*, 2006). Des études antérieures ont montré que les polyphénols tels que l'acide caféïque ou l'acide chlorogénique peuvent être utilisés comme des agents thérapeutiques neuroprotecteurs, avec un potentiel thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer (Habtemariam, 2017).

Des études antérieures ont indiqué que le genre *Helichrysum* possède des métabolites secondaires qui sont responsables de l'activité anti-inflammatoire, antioxydante, et antimicrobienne et antivirale (Aslan *et al.*, 2006; Van Vuuren *et al.*, 2006 ; Albayrak *et al.*, 2010a et b; Orhan *et al.*, 2014). Ceux-ci comprennent l'apigénine, le kaempférol, l'hélihumilone, la quarcétine et la quinine.

L'apigénine (5,7,4'-trihydroxyflavone) est un flavonoïde abondant dans le genre *Helichrysum* qui peut réduire la pression artérielle et possède également des propriétés antioxydantes, antitumorales et antispasmodiques (Liu *et al.*, 2013)..

Nayaka *et al.*, (2014) ont démontré que l'apigénine possède une activité antimicrobienne contre *P.aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *P. mirabilis* et *E. aerogenes*. Kaempférol est un flavonoïde était auparavant isolé à partir d'extraits méthanoliques de *H. obconicum* (Gouveia et Castilho, 2011), Le kaempférol a une activité cardio-tonique, une activité anti-ulcéreuse, anticancéreuse et un antioxydant (Chen et Chen, 2013 ; Waghmare *et al.*, 2010).

Le kaempférol et le kaempférol-3-glucoside ont déjà été identifiés dans les extraits de *H. obconicum*, *H. italicum* et *H. stoechas* (Sobhy et El-Feky, 2007, Gouveia et Castilho, 2011; Guinoiseau *et al.*, 2013).

La quercétine est un flavonol qui est abondant dans les plantes médicinales, elle possède des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-agrégantes, anti-cancérogènes et activité vasodilatatrice (Wiczowski *et al.*, 2003 ; González-Gallego *et al.*, 2007 ; Chirumbolo, 2010 ; Selvakumar *et al.*, 2011).

Des extraits bruts de *H. stoechas*, *H. decumbens* et *H. italicum* ont des activités antimicrobiennes contre l'*E. coli*, *Candida albicans*, *Penicilium sp*, *Cladosporium herbarum* et *Phytophthora capsicii* (Tomás-Barberan *et al.*, 1990, Mastelic *et al.*, 2005, Shoby et El-Feky, 2007). Les extraits bruts de *H. pedunculatum* ont présenté des bioactivités contre toutes les bactéries Gram-positives étudiées ainsi que deux bactéries Gram-négatives, *Enterobacter cloacae* et *Serratia marcescens* (Dilika *et al.*, 2000; Ncube *et al.*, 2008).

Partie II. Matériels et méthode

II.1. Récolte et préparation du matériel végétal

Les parties aériennes de la plante ont été collectées pendant la saison de floraison en mai 2010 - 2014 dans les montagnes de Dirah (wilaya de Bouira) située dans l'est de l'Algérie à une altitude de 250 m (carte géographique). L'identification de la plante a été faite d'après la nouvelle flore d'Algérie de Quezel et Santa (1962).

Les parties aériennes de *Helichrysum stoechas* ont été découpées en petits morceaux et séchées à l'abri du soleil, à la température du laboratoire pendant environ une semaine et stockées dans les récipients stériles pour la préparation des extraits

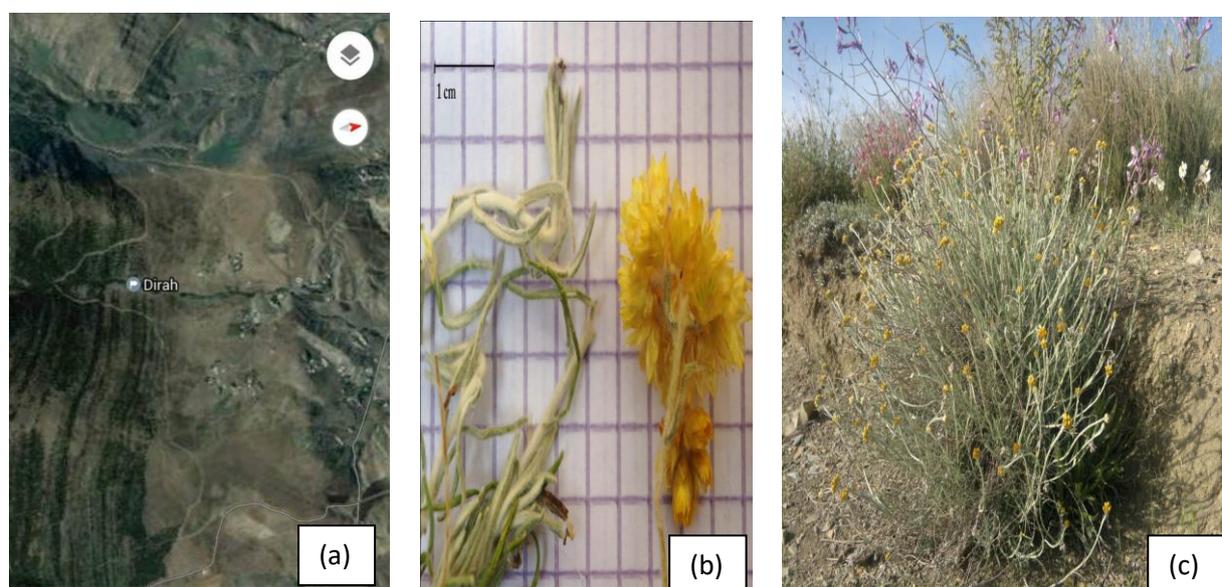


Figure. 5: *Helichrysum stoechas* (L.) Moench

(a): Carte géographique représente le lieu de la récolte, (b) : Echantillon préparé au laboratoire (c) : Vue sur le terrain.

II.2. Etude phytochimique

II.2.1 Préparations des extraits végétaux

Les différents types d'extraits ont été préparés à partir de parties aériennes de *Helichrysum stoechas* secs.

II.2.1.1 Extraction à froid

II.2.1.1.1 Macération

L'extrait hydro-alcoolique et l'extrait aqueux des parties aériennes (tiges feuilletées et fleurs) de la plante *Helichrysum stoechas* ont été préparés selon la méthode décrite par Coulibaly *et al.* (2011). 50 g du matériel végétal broyé est mise à macérer dans 500 ml d'un mélange éthanol/eau (80/20 : V/V) ou 500 mL d'eau distillée sous agitation magnétique et à une température ambiante. Cette macération est répétée 3 fois successivement avec renouvellement du solvant chaque 24 heure. Les macérât aqueux et hydro-alcoolique obtenus sont soumis à la double filtration sur coton hydrophile et sur papier filtre Whatman N°1.

Les filtrats obtenus sont concentrés à l'évaporateur rotatif de type (Büchi R 114) à la température de 45°C et 50°C respectivement. Après séchage à l'étuve (45 °C) pendant 24 h, les extraits obtenus ont été nommés EtOH_(M) et Aq_(M) et utilisés pour les tests phytochimiques et biologiques.

II.2.1.2. Extraction à chaud

II.2.1.2.1. Décoction

Extraction par décoction a été effectuée sur la plante *Helichrysum stoechas* selon le protocole décrit par Chavan *et al.*, (2001) ; Mahmoudi *et al.*, (2013). Une quantité de 50 g du matériel végétal broyé est mise à bouillir pendant 15 minutes dans 500 ml d'un mélange éthanol/eau (80/20: V/V) ou 500 ml d'eau distillée. Après filtration sur Büchner, les filtrats ont été ensuite concentrés et séchées dans l'étuve et nommés EtOH_(D) et Aq_(D) puis conservée à 4°C pour des travaux ultérieurs.

II.2.1.2.2. Extraction par soxhlet

Un échantillon de 20 g de la partie aérienne de la plante est soumis à l'extraction par l'éthanol 80% au Soxhlet, pendant 6 heures. Les extraits hydro-alcooliques sont évaporés sous vide à une température de 50°C (Amirah et Maksudur, 2012).

II.2.1.2.3. Infusion

L'extrait aqueux de la plante est préparé par l'infusion de 1g dans 200 mL de l'eau distillée bouillante pendant 10 min, et laisser refroidir, puis filtré sous pression réduite et conservé au réfrigérateur à 4°C (Guimarães *et al.*, 2013).

II.2.2. Analyses qualitatives et quantitatives des extraits de plante

Cette étude permet de mettre en évidence la présence de quelques groupes des métabolites secondaires dans la plante.

II.2.2.1. Réactions de caractérisation

L'analyse phytochimique a été réalisée sur l'extrait obtenu par l'infusion des tiges feuillues et les fleurs en utilisant des procédures chimiques pour identifier les différents constituants comme décrit par Aiyegoro et Okoh (2010), Tamilselvi *et al.*, (2012) et Sheikh *et al.*, (2013). La révélation de certaines familles chimiques de la plante a été réalisée grâce aux tests de détection chimique telle que : les alcaloïdes (test de Mayer et réactif de Dragendorff), les composés phénoliques et les tanins (réaction au chlorure ferrique), les flavonoïdes (réaction à la cyanidine), les saponines (indice de mousse), les stérols et triterpènes (réaction de Liebermann Buchard), coumarines (test de confirmation).

II.2.2.1.1 Détection des polyphénols

Les polyphénols sont des groupes de molécules de structures variées. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence de noyaux aromatiques (benzénique) porteurs de fonctions hydroxyles (phénoliques).

L'extrait (50 mg) a été dissous dans 5 ml d'eau distillée. A ceci, 3 ml d'acétate de plomb à 10% ont été ajoutés. un précipité blanc indique la présence des polyphénols (Tamilselvi *et al.*, 2012).

II.2.2.1.2. Détection des tannins

Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles. On distingue des tanins galliques qui sont des esters de l'acide gallique et du glucose qui sont des composés hydrolysables et des tanins catéchiques ou tanins condensés non hydrolysables.

2 ml d'infusé sont prélevés, aux quels sont ajoutés quelque gouttes de chlorure ferrique FeCl₃ à 2%, la coloration bleu-noir ou vert-noir ou la précipitation confirme la présence des tannins tanins condensés. Lorsqu'on ajoute l'acétate de sodium, la formation d'un précipité indique la présence des tannins galliques (Békro *et al.*, 2007).

II.2.2.1.3 Détection des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont très répandus chez les végétaux. Ils constituent les principaux pigments jaunes des fleurs et certains fruits. Leur présence ou leur absence dans un extrait peut être mise en évidence par la réaction à la cyanidine (test de Shinoda). Cette réaction utilise en effet le pouvoir réducteur de métaux en milieu acide pour réduire spécifiquement le noyau flavonoïdique. Le test consiste à ajouter à 4ml de l'infusé, quelques gouttes d'HCl concentré (5 à 6) et deux à trois copeaux de magnésium. Laisser agir 3 min et observer le changement de couleur. La présence de flavonoïdes est confirmée par la coloration rouge. (Aiyegoro et Okoh., 2010 ; Sheikh *et al.*, 2013).

II.2.2.1.4. Détection des coumarines :

Un gramme de poudre végétale est placé dans un tube, on l'additionne de quelque gouttes d'eau, le tube est recouvre de papier imbibé de NaOH dilué, puis porté à l'ébullition. Toute fluorescence jaune indique la présence des coumarines après l'examen sous l'UV (Nanna *et al.*, 2013).

II.2.2.1.5. Détection des saponines

La mise en évidence des saponines dans un extrait végétal est basée sur la capacité d'une solution aqueuse de l'extrait à donner une mousse, après agitation. Cette propriété est à la base de la méthode permettant d'apprécier la richesse d'un extrait en saponosides : mesure de l'indice de mousse.

Pour mettre en évidence les saponines, nous avons introduit 10 ml d'extrait aqueux dans un tube à essai. Le tube est agité quelque secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides (Tamilselvi *et al.*, 2012).

La mousse a été mélangée avec 3 gouttes d'huile d'olive et agitée vigoureusement après quoi il a été observé pour la formation d'une émulsion (Abbasi et al., 2013).

II.2.2.1.6. Les stérols et polyterpènes

Les stérols et les polyterpènes ont été mis en évidence par la réaction de Liebermann-Buchard. 1ml d'infusé est mélangé à chaud avec 1ml de chloroforme, dans un tube à essai dans lequel sont coulés lentement 0,5 ml une solution concentrée de l'acide sulfurique pour former une couche. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive. La couleur bleu pour les terpénoïdes et verte pour les stéroïdes (Joshi *et al.*, 2011).

II.2.2.1.7. Les alcaloïdes

II.2.2.1.7.1. Test de Dragendorff

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des réactifs Dragendorff (réactif à l'iodobismuthate de potassium). Dix (10) ml de l'infusé ont été évaporés à sec. Le résidu est repris par 10 ml d'alcool à 60°. L'addition de 2 gouttes du réactif de Dragendorff sur la solution alcoolique provoquerait un précipité ou une coloration orangée (N'guessan *et al.*, 2009).

II.2.2.1.7.2. Test de Mayer

Les solutions alcaloïdes neutres ou légèrement acide produisent un précipité jaunâtre quand quelques gouttes de réactifs de Mayer sont ajoutés de ce fait 10 ml d'extrait évaporé, le résidu est chauffé sur un bain d'eau bouillante avec 1,5 ml de d'acide chlorhydrique 2%. Après refroidissement, le mélange est filtré et traité avec quelques gouttes de réactif de Mayer. Les échantillons sont observés pour la présence de turbidité ou de précipitation jaune (Joshi *et al.*, 2011).

II.2.2.2. Criblage qualitatif par CCM

La mise en évidence des différents composés chimiques dans les extraits s'est faite par chromatographie sur couche mince (CCM) selon la méthode utilisée par Kouadio *et al.*, (2015). Cette méthode permet la mise en évidence de plusieurs groupes de métabolites secondaires par des colorations spécifiques, soit dans le visible ou à une longueur d'onde donnée (N'gaman *et al.*, 2009).

Dix (10) mg d'extraits ont été dissouts dans 1 mL de méthanol absolu pour obtenir une solution d'une concentration de 10 mg/mL. Dix microlitres (10 µl), soit 100 µg de cette solution sont analysés sur chromatoplaque (silica gel 60 F254 en aluminium, Merck) par les gradients de solvants de migration [Acétate d'éthyle /Méthanol/Eau (v/v/v) (100/13,5/10 ;

Acétate d'éthyle/Acide acétique glaciale/Acide formique/Eau distillée (100:11:11:27 v/v/v/v) ; Chloroforme / Acétate d'éthyle /Acide acétique (v/v/v) (50/50/10)] (Pepeljnjak *et al.*, 2005). Après séchage, les chromatogrammes sont révélés soit dans le visible soit sous UV/254 /366 nm avec ou sans révélateurs appropriés. Les spots ont été marqués à l'aide d'un crayon et les rapports frontaux (R_f) des différentes taches observées sont calculés selon la formule suivante :

$R_f = \text{Hauteur de migration de composé} / \text{Hauteur du front de solvant.}$

Les meilleurs chromatogrammes des extraits ont été obtenus avec un gradient. Acétate d'éthyle-acide acétique glaciale - acide formique - eau distillée (100:11:11:26 v/v/v/v).

II.2.2.3. Analyses quantitatives

II.2.2.3.1. Détermination des composés phénoliques totaux

La teneur totale en polyphénol de différents extraits de la plante a été déterminée par colorimétrie par la méthode de Folin-Ciocalteu (un mélange de phosphomolybdate et phosphotungstate) mentionnée par Albayrak *et al.* (2010a, 2010b, 2013).

Dans un tube à essais 20 μl de l'extrait de plante (1 mg/ mL) ont été mélangés avec 1,2 mL d'eau distillée, puis 100 μl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué avec l'eau distillée (1:10v/v) a été ajouté et le contenu a été mélangé soigneusement. Après 3 min, 300 μl de carbonate de sodium (Na_2CO_3 à 7,5%) ont été ajoutés et le volume a été porté à 2,0 mL avec de l'eau distillée. Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 765 nm et comparée à une courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0-200 $\mu\text{g/mL}$). Les résultats sont présentés comme la moyenne des trois exemplaires et exprimés en microgramme d'équivalents de l'acide gallique (EAG) par milligramme d'extrait sec en appliquant la formule suivante :

$$C = (c \times V) / m$$

C : La teneur en phénols totaux (mg d'acide gallique/ g de matière sèche).

c : La concentration de l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/mL).

V : Volume de l'extrait

m : Le poids de la matière sèche (mg).

II.2.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits de la plante (Patel *et al.*, 2014).

À 1 mL d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) est ajouté 1 mL de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de la réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) réalisée par la quercétine à différentes concentrations (0-40 $\mu\text{g/mL}$) dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait sec (mg EQ/mg d'extrait sec).

II.2.2.3.3. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode au chlorhydrate de vanilline décrite par Mukhopadhyay *et al.* (2015). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm.

Un volume de 0,4mL d'extrait (1 mg / mL) a été ajouté à 3 mL d'une solution de vanilline (4% p / v dans le méthanol) et 1,5 mL d'acide chlorhydrique concentré. Après 20 minutes d'incubation à la température 30°C, l'absorbance a été lue à 500 nm contre un blanc en utilisant un spectrophotomètre UV-VIS (Evolution 201, Thermo Scientifique).

La concentration de tanin a été déterminée par rapport à une courbe standard d'acide tannique (0-1000 mg / mL). Les résultats ont été exprimés en microgrammes d'équivalents d'acide tannique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAT} / \text{mg}$).

II.3. Activités biologiques des extraits

La présente étude, s'intéresse particulièrement à l'activité antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire et antidiabétique des extraits d' *Helichrysum stoechas*.

II.3.1. Les activités antioxydantes

La mesure du potentiel antioxydant est réalisée en déterminant les produits résultant de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels.

Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* des extraits, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capable d'inhiber la génération de radicaux.

Les différents tests que nous avons utilisés sont:

Le piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle), le test de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), la capacité antioxydante totale (CAT) et le piégeage du radical hydroxyle.

II.3.1.1. La méthode de piégeage du radical libre DPPH[•]

La méthode du DPPH[•] est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH[•] en présence d'anti-radicalaire donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPH-H.

On peut résumer cette réaction par l'équation suivante (Fig. 6):

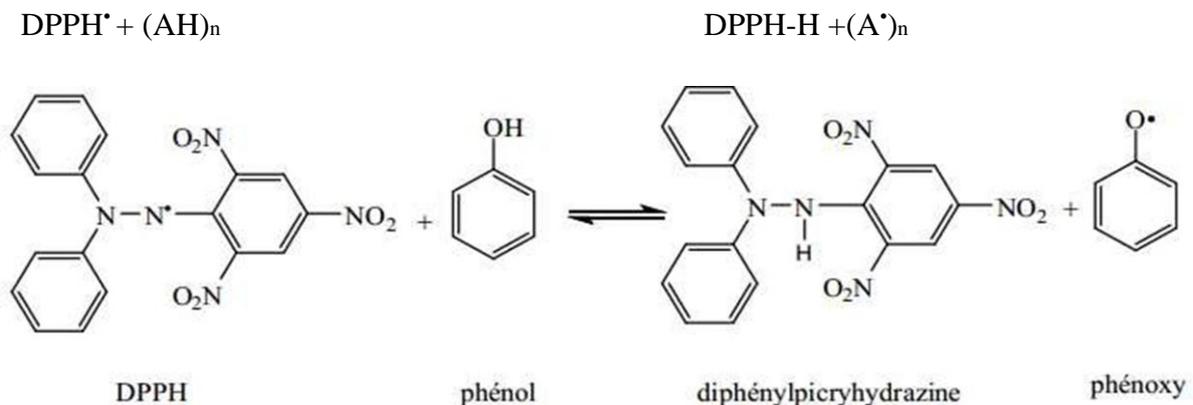


Figure. 6 : Mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le DPPH[•] (Molyneux, 2004)

La réduction du DPPH[•] en DPPH-H induit une perte de sa couleur pourpre qui peut être suivie à 517 nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH[•] est réduit et change de couleur en virant au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance. La décoloration de DPPH[•] est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques.

50µl de chaque d'échantillon ou de standard à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 mL de la solution méthanolique du DPPH[•] (0,025g/l).

En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µl de méthanol avec 1,95 mL de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par des solutions d'antioxydant standard; le Butyl-Hydroxy Toluène (BHT) dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons tests. (Heilerová, *et al.*, 2003; Batiston *et al.*, 2013).

Expression des résultats

- Calcul des pourcentages d'inhibition :

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abs \text{ c} - Abs \text{ t}) / Abs \text{ c}] \times 100$$

Abs c: Absorbance du contrôle, Abs t : Absorbance de l'échantillon testé.

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures.

La capacité de piégeage des extraits a été exprimée en IC₅₀ obtenue à partir du graphe de l'activité de piégeage (en%) tracé en fonction de la concentration des échantillons, elle est nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

II.3.1.2. La méthode de réduction du fer (FRAP : *Ferric reducing antioxidant power*)

Le pouvoir réducteur est basé sur la transformation de Fe⁺³ présent dans le complexe K₃Fe(CN) (ferricyanure de potassium) en Fe⁺² en présence d'un antioxydant qui a le pouvoir de céder des électrons.

La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe²⁺), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm. Le pouvoir réducteur de la plante a été déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986) (in Jalili *et al.*, 2012). L'extrait à différentes concentrations, le tampon phosphate (1 mL, 0,2 M, pH 6,6) et le ferricyanure de potassium (1,0 mL, 10 mg / mL) ont été mélangés et incubés à 50°C dans un bain d'eau pendant 20 minutes. Après refroidissement de l'acide trichloroacétique (1,0 mL, 100 mg / mL) a été ajouté au mélange pour arrêter la réaction puis centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant (1,0 mL) a été mélangé avec de l'eau distillée (1,0 mL) et du chlorure ferrique (0,1 mL, 1,0 mg / mL). Le mélange est laissé reposer 30 min (Hendra *et al.*, 2011), puis l'absorbance a été mesurée à 700 nm. Un blanc a été préparé sans ajout d'extrait. Le contrôle positif est représenté par une

solution à diverses concentrations d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés à testés (Amarowicz *et al.*, 2004).

L'activité antioxydante de la l'extrait était exprimé en EC₅₀. Cette valeur ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) est la concentration efficace donnant une absorbance de 0,5 pour réduire la puissance, et a été obtenue à partir de analyse de régression linéaire.

II.3.1.3. Évaluation de la capacité antioxydante totale

II.3.1.3.1. Principe

Ce test est basé sur la réduction du molybdate Mo (VI) en Mo (V) en présence des composés antioxydants et donc la formation d'un complexe verdâtre de (phosphate /Mo) à un pH acide. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (P/Mo). Ce transfert dépend du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant (Muanda *et al.*, 2009 ; Aliyu *et al.*, 2012).

II.3.1.3.2. Le mode opératoire

La capacité antioxydante totale des extraits a été déterminée par spectrophotométrie par le dosage du phosphomolybdène en utilisant la méthode décrite par (Prieto *et al.*, 1999), citée par Kasangana *et al.*, (2015). Brièvement, 0,3 mL d'une solution d'extrait à 1 mg/mL dans du diluant (éthanol ou l'eau distillée) a été mélangé avec 2,7 mL de réactif phosphomolybdène (phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM dans de l'acide sulfurique 0,6 M) dans des tubes à essai. L'incubation a ensuite été effectuée pendant 90 minutes dans un bain-marie à 95 ° C. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance des solutions a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre UV-visible à 695 nm contre un blanc (0,3 mL de diluant sans extrait végétal).

La capacité antioxydante de chaque échantillon a été exprimée en équivalent d'acide ascorbique(EAA) en utilisant l'équation linéaire suivante:

$[A = x \ C + b ; R^2 =]$ où A : l'absorbance à 695 nm et C : la concentration en équivalent d'acide ascorbique ($\mu\text{g} / \text{mL}$). Les valeurs sont présentées comme les moyens de l'analyse en triple.

II.3.1.4. Activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'U.V. Comme la concentration de H₂O₂ diminue par les composés piégeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230 nm diminue également.

La capacité des extraits à piéger le peroxyde d'hydrogène est estimée selon la méthode décrite par Ruch *et al.*, 1989 (in Lalisa Wakjira Duresa, 2017). Une solution de peroxyde d'hydrogène (40 mM) a été préparée dans un tampon phosphaté (0.1M, pH 7,4).

Un volume de 0,1 mL d'extraits à différentes concentration a été transféré dans les tubes à essai et leur volumes a été complété à 0,3 mL avec du tampon phosphaté. Après l'addition de 0,6 mL de solution de peroxyde d'hydrogène, les tubes ont été agités, après 10 min, l'absorbance du peroxyde d'hydrogène a été déterminée à 230 nm contre une solution à blanc contenant un tampon phosphaté sans peroxyde d'hydrogène. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif. La capacité de piégeage de peroxyde d'hydrogène a été calculée en utilisant l'équation suivante:

Activité de piégeage de H₂O₂ (%) = $[A_0 - A_1 / A_0] \times 100$ où A₀ est l'absorbance du contrôle et A₁ est l'absorbance en présence de l'échantillon.

Le pourcentage de capacité de piégeage des radicaux obtenu donne la valeur IC₅₀, qui représente les concentrations d'extraits qui ont provoqué une neutralisation à 50%, déterminé par une analyse de régression linéaire d'une courbe standard: Absorbance = a [H₂O₂] + b. Toutes les mesures ont été effectuées en trois exemplaires.

II.3.2. Activité antimicrobienne

II.3.2.1. Microorganismes étudiés

Les souches de référence sont sous forme de lots "American Type Culture Collection" ATCC et sont : *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC4352), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Bacillus cereus* (ATCC10876), *Enterococcus faecalis* (ATCC2035) et *Candida albicans* (ATCC 10231). Ces souches sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive.

II.3.2.2. Technique de diffusion en gélose par puits

Les tests de l'activité antibactérienne et antifongique des différents extraits ont été réalisés en utilisant la méthode de diffusion suivant la procédure décrite par Manasa *et al.* (2015). Les microorganismes issus d'une culture de 18 à 48 heures incubés à 37°C ont été suspendus dans de l'eau salée (NaCl 0,85% (w/v) a une turbidité correspondant au Mac Farland 0.5. Cette suspension a été utilisée pour ensemercer des boîtes de Petri par écouvillonnage. Des puits de 6 mm de diamètre ont été effectués dans la gélose à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Chaque puits a reçu 50 µl d'extrait testé aux concentrations 150, 100 et 50 mg/mL. Pour les antibiotiques les disques ont été déposés directement sur la gélose. Les extraits aqueux ont été dissous dans de l'eau distillée tandis que les extraits hydro-alcooliques dans du DMSO à 1%. Après 30 min de diffusion à la température ambiante, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 18 à 48 h.

La lecture a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puits à l'aide d'un pied à coulisse.

Les valeurs de diamètre trouvé pour les différentes concentrations de chaque extrait sont interprétées selon Moreira *et al.* (2005) ; Celikel et Kavas, (2008) : Résistante : diamètre inférieur à 8 mm ; sensible : diamètre compris entre 9 et 14 mm ; très sensible: diamètre compris entre 15 et 19 mm ; extrêmement sensible : diamètre supérieur à 20 mm.

II.3.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 72 heures.

Elle a été évaluée par la méthode de microplaque à 96 puits à fond rond de culture cellulaire selon la méthode décrite par Lawal *et al.*, (2015).

Dans les cupules d'une même ligne, les dilutions de l'extrait de la plante à tester et la souche microbienne sont introduit à l'aide d'une micropipette. S'ensuit une incubation pendant 24-48 h à la température optimale, puis une observation de la plaque et une éventuelle croissance de germes dans chaque cupule (ou un dépôt au fond de la cupule) est notée.

La technique consiste à réaliser pour chaque extrait et le témoin une gamme de dilutions dans le bouillon Müller-Hinton à partir de la solution mère et déposé à l'intérieur des puits de la microplaque au volume de 100µl.

A partir de 20mg d'extrait de plante, la solution mère est préparée à 20mg/mL en ajoutant 100µl de méthanol et 900µl de l'eau stérile. Les dilutions successives en série par progression géométrique de raison 2 se font dans le bouillon Müller-Hinton. La gamme de concentration testée est de 10 - 0.00976 mg/mL.

Pour les antibiotiques, la gentamicine est utilisé comme contrôle positif, la procédure se fait de la même manière (les concentrations finales de 0,08– 40 µg/mL à partir d'une solution mère contenant 400 µg/mL de la gentamicine).

A partir d'une culture en phase exponentielle de croissance, une suspension bactérienne à 10^8 UFC/mL a été diluée au 1/1000 pour avoir une concentration de 10^5 UFC/mL. Dans chaque puits, on met 100µl de la suspension bactérienne et 100µl de la solution d'extraits ou standard.

Un contrôle de croissance (inoculum seul) pour chaque souche a été inclus également dans l'essai est considéré comme contrôle négatif. Une ligne de la plaque sans extrait de plante a été servie de témoin pour la croissance de l'organisme (contrôle négatif) et un autre sans extrait de plante et l'inoculum a été servi comme tests de stérilité de milieu (contrôle positif). Pour chaque extrait testé, les tests ont été effectués en duplicata sur la même microplaque

Après incubation, en tant qu'indicateur de croissance bactérienne 40 µl de 0,2 mg / mL de solution de p-Iodonitrotétrazolium (INT) ont été ajoutés à chaque puits et incubé pendant 30 minutes à 37°C. Le sel de tétrazolium incolore était réduit à un produit de couleur rouge par l'activité biologique de microorganismes (le réactif est réduit par déshydrogénase correspondant à l'intensité coloré formazan). La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été retenue comme la concentration minimale pour laquelle aucun changement de couleur du milieu n'est observé.

La concentration minimale bactéricide (CMB) a été déterminée par des sous-cultures. Cinquante microlitres (50 µl) du contenu des puits avec une concentration supérieure ou égale à CMI ont été introduits dans 150 µl de milieu de bouillon nutritif. Après 48h d'incubation à 37 ° C, subcultures pour lesquels il n'y avait pas de reprise de la croissance correspondait à CMB (Nanyonga *et al.*, 2013).

Le rapport CMB/CMI a permis de préciser la modalité d'action des extraits. Selon Koffi et al (2018), l'extrait est bactéricide quand sa CMB est égale à sa CMI ou si le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 4. Il est dit bactériostatique quand sa CMB est supérieure à sa CMI ou si le rapport CMB/CMI est plus élevé que 4. Lorsque ce rapport est égal à 32, la souche est dite tolérante.

II.3.3. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

II.3.3.1. Introduction

Les enzymes lysosomales libéré lors de l'inflammation provoquent une variété de troubles qui conduit à la lésion tissulaire et la peroxydation lipidique des membranes qui sont supposés être responsables de certaines pathologies comme les crises cardiaques, les chocs septiques et la polyarthrite rhumatoïde. La stabilisation de membrane lysosomale est important pour limiter la réponse inflammatoire en inhibant la libération de constituants lysosomales des membranes. La membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale et son stabilisation implique que l'extrait peut ainsi stabiliser les membranes lysosomales. Ainsi la stabilisation membrane de globule rouge est déterminée par hypotonicité induite et l'hémolyse induite par chaleur est considérée comme mesure *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire des médicaments ou des extraits de plantes.

Ce test a pour but d'évaluer sur des hématies humaines, l'activité anti-inflammatoire des extraits isolés. Il a été effectué selon la méthode décrite par Ukwuani et Hassan (2015), avec quelques modifications.

II.3.3.2. Matériel utilisé

Le matériel est constitué d'hématies humaines fournies par l'hôpital de M'sila, extrait éthanolique *H. stoechas* obtenu par soxhelet, du DMSO, et du tampon PBS du pH 6,3 et 7,4. Ce tampon PBS est composé de 137mM de NaCl, de 2,7 mM de KCl, de 1,5 mM de KH_2PO_4 et de 1mM de Na_2HPO_4 .

II.3.3. 2.1. Préparation des globules rouges humains.

Une suspension du sang humain frais entier a été collectée et mélangé avec un volume égal de solution (2% de dextrose, citrate de sodium à 0,8%, 0,05% d'acide citrique et du chlorure de sodium à 0,42%). Le sang a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min, les cellules ont été

lavé trois fois avec un tampon PBS (pH 7,4). Le volume du sang a été mesuré et reconstitué en tant que 10% v / v de suspension avec le tampon PBS (Oyedapo *et al.*, 2010).

II.3.3.3. Hémolysé induite par hypotonicité

Le mélange d'essai contient du tampon phosphate de 1mL (pH 7,4), 2 mL hypo saline (0,36%), 0,5 mL de suspension du sang (10% v / v), 0,5 mL d'extraits de plantes ou médicament standard diclofenac sodique de diverses concentrations (50, 100, 250, 500, 1000 µg / mL) et le contrôle positif (le triton X100 1% au lieu de solution hypo-saline pour produire 100% d'hémolyse) a été incubé à 37 ° C pendant 30 min et centrifugé respectivement. La teneur en hémoglobine dans le surnageant a été estimée à l'aide de spectrophotomètre à 560 nm (Sumathi et Anuradha, 2016).

Le pourcentage d'hémolyse des hématies peut être calculé comme suit:

% Hémolysé = (densité optique de test échantillon / densité optique de contrôle) X 100

Le pourcentage de stabilisation de membrane peut être calculée comme suit:

% Protection = 100 - [(densité optique de test échantillon / densité optique de contrôle) X 100].

II.3.3.4. Hémolysé induite par chaleur

3,5mL de tampon PBS (pH 7,4) contenant des extraits et le diclofenac sodique comme standard à différents concentrations sont mises dans de tubes de centrifugation. Une suspension du sang à 10% (500 µl) a été ajoutée à chaque tube et on mélange doucement par inversion. Un blanc de chaque concentration des extraits est réalisé sans ajout du sang. Un témoin négatif sans extraits (0% hémolysé), témoin positif d'hémolyse totale sont aussi réalisé avec du triton X100 1% à la place des extraits, les tubes ont été mis en incubation à 56°C pendant 30 min dans un bain d'eau. Après refroidissent, le mélange réactionnel a été centrifugé pendant 5 min à 3000g et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 560 nm (Akinwunmi *et al.*, 2015). Le pourcentage d'inhibition ou d'accélération de l'hémolyse dans les essais et a été calculée selon l'équation:

% Hémolysé = (densité optique de test échantillon / densité optique de contrôle) X 100

Le pourcentage de stabilisation de membrane peut être calculée comme suit:

% Protection = 100 - [(densité optique de test échantillon testé / densité optique de contrôle) X 100] (Sumathi et Anuradha, 2016).

II.3.3.5. Méthodes de dénaturation de l'albumine

Le mélange réactionnel (0,5mL) est constitué de 50µl d'extrait d'essai à différente concentration (50, 100, 250, 500, 1000 and 2000 µg/mL) et 0,45 mL de 5% de solution aqueuse de la fraction d'albumine bovine, le pH du mélange réactionnel est ajusté à 6.3 à l'aide de HCl.

Les extraits d'échantillons ont été incubés à 37 ° C pendant 20 min, puis chauffé à 56 ° C pendant 20 min, après refroidissement, 2.5 mL de tampon PBS (pH 6,3) est additionné. La turbidité des échantillons a été mesurée par spectrophotométrie à 660 nm (Anyasor *et al.*, 2015). L'expérience a été réalisée en trois exemplaires.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit:
 $\% \text{ inhibition} = \left[\frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \right] \times 100$ (Jayaprakasam et Ravi, 2012).

II.3.4. Evaluation de la toxicité et de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

II.3.4.1. Introduction

Helichrysum stoechas est utilisé dans la médecine traditionnelle par la population européenne et africaine pour ces propriétés cicatrisante et pour soulager la douleur (colique, rénale et dents). Il a été rapporté que *Helichrysum stoechas* possède des propriétés antibactériennes (Sobhy et EL-Feky, 2007), antioxydants (Carini *et al.*, 2004) et anti inflammatoires (Recio *et al.*, 1991).

L'objectif de cette étude est de confirmer l'activité anti inflammatoires de l'extrait ethanologique et d'évaluer sa toxicité per os .

II.3.4.2. Le test de toxicité

La méthode de Kerber implique l'administration de différentes doses de substance d'essai à divers groupes de quatre souris chacun (28-40g) élevées dans du laboratoire de l'animalerie. Cette méthode implique le dosage de toxicité des animaux avec la substance d'essai dans un intervalle de temps de 48 heures. Après l'administration de la première dose, la suivante est déterminée par le résultat de la dose subséquente administrée. Si l'animal survit à la dose suivante, la dose est augmentée, mais lorsque la mortalité est enregistrée à la dose suivante, elle est diminuée. L'ajustement de la dose soit vers le haut, soit vers le bas est un facteur

constant. Les essais sont terminés lorsque la limite supérieure (2000-5000 mg / kg) a été atteinte sans mortalité ou lorsque la DL₅₀ a été établie à partir de l'essai. (Chinedu *et al.*, 2013) (Maheshwari et Shaikh Nusrat, 2016).

Les souris sont mises à jeun pendant 24 h. Le premier groupe ou groupe-témoin reçoit de l'eau distillée tandis que les groupes 2 à 5 reçoivent différentes dose unique de l'extrait éthanolique de *H.stoechas* (1g/kg, 2g/kg, 4g/kg, 5g/kg, 6g/kg) dissous dans 1mL d'eau distillée, à l'aide d'une sonde de gavage. L'évolution des comportements tels que l'agitation, la fatigue, la diarrhée, le grattage, les mouvements de la queue, la perte des poils et la mortalité des animaux est suivie pendant 2 jours. Tous les animaux reçoivent normalement de l'eau et les aliments toute la durée de l'expérimentation. La moyenne d'intervalle d'un certain nombre de décès enregistrés dans chaque groupe et la différence de dose entre les groupes sont des paramètres clés de cette méthode. (Maheshwari et Shaikh Nusrat, 2016). La DL₅₀ est calculée en utilisant la méthode arithmétique de Karber (1931) (In AL-Jubory, 2013), selon l'équation suivante:

$$DL_{50} = D_m - \frac{\sum (z \times d)}{n}$$

Où, DL₅₀ = dose létale médiane qui tue 50% des animaux.

D_m = La dose la plus faible requise pour tuer 100%

z = la moyenne de la somme des morts à deux doses consécutives.

d = la différence entre deux doses consécutives.

n = nombre d'animaux utilisés par lot

II.3.4.3. Protocole expérimental de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

Pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'extrait d'une plante médicinale, un modèle expérimental d'inflammation aigue de la patte de la souris induit par l'Agar-Agar a été sélectionné (Iwueke *et al.*, 2006)

II.3.4.3.1. Principe : L'injection de l'agar-agar sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure de la souris entraîne l'apparition d'un œdème de la région métatarsienne. L'intensité de cet œdème, qui atteint son maximum de développement en 6 heures, est évaluée grâce à l'augmentation du volume de la patte (par rapport au volume initial).

L'administration préventive par voie orale d'un produit anti-inflammatoire réduit de façon significative le développement de l'œdème.

II.3.4.3.2. Prétraitement par l'extrait éthanolique obtenu par soxhlet

Mettre les souris à jeun pendant 18 heures avec accès libre à l'eau. Au moment de l'expérimentation, peser les souris et les répartir en lots homogènes si possible de quatre souris. Une heure avant l'injection de l'Agar-Agar, un effectif de 28 souris pesant entre 27 et 40g est divisé en sept groupes selon la dose de l'extrait et le standard chaque groupe reçoit par voie orale (Fig. 7) les solutions expérimentales comme suit :

- ✓ **Groupe normale sans Agar-Agar** (n=4) a reçu une solution de NaCl (0,9%) au niveau de l'aponévrose de la patte postérieure droite par injection et une solution de NaCl (0,9%) par voie orale (10mL/kg)
- ✓ **Groupe témoin avec Agar-Agar** (n=4): a reçu une solution d'Agar-Agar (2%) au niveau de l'aponévrose de la patte postérieure droite par injection d'une solution de NaCl (0,9%) (10mL/kg p.o)
- ✓ Groupe I avec Agar-Agar (n=4) a reçu de l'extrait éthanolique à la dose de 250 mg/Kg de PC dissous dans du NaCl 0,9%.
- ✓ Groupe II avec Agar-Agar (n=4) a reçu de l'extrait éthanolique à la dose de 500 mg/Kg de PC dissous dans du NaCl 0,9%.
- ✓ Groupe III avec Agar-Agar (n=4) a reçu de l'extrait éthanolique à la dose de 1000 mg/Kg de PC dissous dans du NaCl 0,9%.
- ✓ Groupe standard avec Agar-Agar (n=4) a reçu diclofénac sodique (100 mg/Kg) dissous dans du NaCl 0,9%. (Jami *et al.*, 2014).
- ✓ Groupe standard +EEtOHHs avec Agar-Agar (n=4) est traité par un mélange de 1000 mg/Kg l'extrait éthanolique et 100 mg/Kg de diclofénac sodique (Al-Salmi *et al.*, 2015).

II.3.4.3.3. Injection de l'Agar-Agar

Une heure après l'administration des traitements, chaque animal reçoit par injection sub-plantaire (intra-articulaire) au niveau de l'aponévrose de la patte postérieure droite de la souris, 0,1 mL d'une suspension d'Agar-Agar à 2% dissous dans du NaCl 0,9% et maintenu dans un bain-marie à $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour garder son homogénéité (Fig.7).

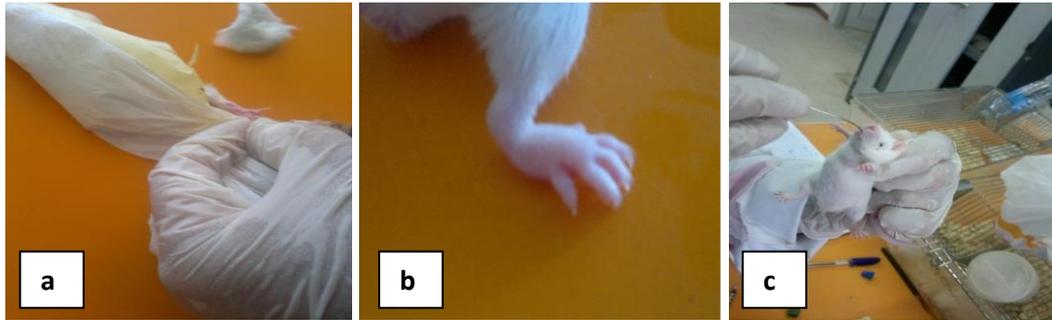


Figure.7 : (a) : Injection sub-plantaire de l'Agar-Agar, (b) : Patte après l'injection, (c) : Administration orale des extraits

II.3.4.3.4. Mesure de l'œdème

Déterminer les volumes au temps T_0 des pattes (V_0), et au temps t (V_t) pour cela remplir le tube (réservoir) en l'eau distillée et régler correctement le niveau d'eau voir (Fig. 8). Tremper ensuite la patte de la souris dans le tube. L'immersion de la patte provoque le déplacement du volume d'eau qui correspond à la quantité de volume de la patte la souris. Ce volume est mesuré par micropipette et enregistré (Omodamiro et Amechi, 2013).

Nous avons effectué une étude cinétique de 6 h avec 1h d'intervalle, cela en référence aux résultats obtenus avec un lot témoin d'essai



Figure.8 : Mesure du volume de gonflement de la patte manuellement à l'aide d'un réservoir contenant l'eau distillée

II.3.4.3.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire est exprimée en variation de volume ($V_t - V_0$) \pm SEM (erreur standard à la moyenne) et en pourcentage d'inhibition ou de réduction de l'œdème pour chaque groupe traité par l'eau distillée, l'extrait et le standard. Les moyennes des groupes

traités par l'extrait et le diclofinaque sodique ont été comparées avec celles des groupes témoins traités par l'eau distillée.

Le volume de l'œdème ou l'indice d'inflammation à un temps donné (V_T) est obtenu par la formule suivante :

$$V_T = V_t - V_0 \text{ (Kalpana } et al., 2015).$$

V_0 : Volume initial de la patte avant de provoquer l'œdème.

V_t : Volume de la patte au temps t (0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 h) après l'injection d'Agar-Agar.

Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation est donné selon la formule suivante :

% Inhibition = $100 \times (P_0 - P_t) / P_t$ ou $(V_t - V_0) \text{ contrôle} - (V_t - V_0) \text{ traités} \times 100 / (V_t - V_0) \text{ contrôle}$ (Ndiaye *et al.*, 2006).

Avec P_0 = augmentation moyenne du volume de la patte du témoin à la ^{nième} heure après injection de l'Agar-Agar.

P_t = augmentation moyenne du volume de la patte traité à la ^{nième} heure après injection de l'Agar-Agar.

II.3.5. Évaluation de l'activité analgésique

II.3.5.1. Évaluation de l'effet analgésique central

Le contrôle de la douleur est l'un des plus importants moyens de dépistage de drogue. Deux type d'analgésiques sont généralement reconnus, ceux qui agissent via le système nerveux central (par exemple, analgésiques opioïdes) qui sont étudiés par des méthodes thermique ou physiques et ceux qui agissent en périphérie par exemple (aspirine) qui sont étudiés par des méthodes chimiques. L'activité analgésique centrale du l'extrait éthanolique et de médicament contre le stimulus thermique a été évaluée chez la souris suivant la méthode de plaque chaude (Ashok et Upadhyaya, 2013 ; Veena *et al.*, 2016) ainsi que la méthode d'immersion de la queue (Alli *et al.*, 2014).

II.3.5.1.1. Procédé de la plaque chaude

Vingt huit souris, divisées au hasard en six groupes ($n=4$ pour chaque groupe) ont été utilisés dans cette expérience. Chaque groupe a reçu une certaine dose de l'extrait de test (250,500 et

1000mg/kg, po en suspension dans l'eau physiologie) et un groupe a reçu le véhicule (l'eau physiologie) pour servir de groupe témoin, le groupe standard Codoliprane® (paracétamol +codaine) et groupe standard combiné avec l'extrait éthanolique à la dose 1000mg/kg, po (Nguelefack *et al.*, 2004). Le test a été effectué 30, 60 et 120 minutes après l'administration de l'extrait végétal ou le véhicule. Chaque souris a été placée dans un bêcher individuellement sur la plaque chauffante ($55 \pm 0,5^\circ\text{C}$) jusqu'à ce que la réponse à la douleur thermique soit observée (Ermeli *et al.*, 2012). Le temps de réaction ou de latence a été pris lorsque l'animal a léché ses pattes ou a essayé de sauter en quelque seconde. Les souris ne sont pas autorisées à rester sur la plaque chaude plus de 30 seconde afin d'éviter les brûlures des pattes (Uddin *et al.*, 2014 ; Kazempor *et al.*, 2015). Les animaux ne répondant pas à l'intérieur de cette période peuvent être considérés comme protégés.

L'activité analgésique a été calculée en utilisant la formule suivante :

Pourcentage d'activité analgésique = $\frac{T_a - T_b}{T_b} \times 100$ (Ullah *et al.*, 2014).

T_a : le temps de réaction initial avant traitement.

T_b : le temps de réaction enregistré lorsque l'animal commence à lécher le pied ou saute hors de la plaque chaude, après l'administration des échantillons.

II.3.5.1.2. Test d'immersion de la queue

Ce test est particulièrement adapté pour évaluer l'effet analgésique central de substances pharmacologiques synthétique ou extraite d'une plante d'étude, dans notre cas l'extrait éthanolique. Il peut également être utilisé pour évaluer la sensibilité de base à la douleur (Alli *et al.*, 2014). La procédure est basée sur l'observation de retrait de la queue chez la souris induit par immersion de 5 cm de l'extrémité inférieure de la queue dans un bain d'eau maintenu à $55^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ (Chatterjee *et al.*, 2015) (Fig. 9). La drogue testée possède une activité analgésique est sélectivement capable de prolonger le temps de réaction du type réflexe de retrait de la queue. Les souris ont été attribués au hasard à 5 groupes de 4 animaux chacun. L'eau distillée (0,9%) a été donné au groupe témoin tandis que le groupe de référence a reçu l'association de paracétamol (400 mg/kg) et codaine (20 mg/kg) po (Nguelefack *et al.*, 2004). Les groupes restants ont reçus l'extrait éthanolique de 250-1000 mg / kg de masse corporelle. Le temps en secondes que met l'animal pour retirer sa queue est mesuré et considéré comme temps de réaction. Suite à l'administration des échantillons, ce temps de réaction a été mesuré après 30, 60, 120 et 180 min (Shah et Seth, 2010). La durée maximale

autorisée pour la queue à rester dans l'eau chaude est environ 30s pour éviter tout dommage tissulaire (Uddin *et al.*, 2014).

Le temps de réaction en seconde été calculé et exprimé en moyenne \pm SEM pour chaque lot. Le calcul du pourcentage d'augmentation du temps de latence de retrait de la queue a été réalisé selon la formule suivante :

$PATL(\%) = \frac{M2 - M1}{M1} \times 100$ (Kouakou *et al.*, 2010).

PATL : Pourcentage d'augmentation du temps de latence.

M1: Moyenne des temps de retrait du lot témoin.

M2 : Moyenne des temps de retrait du lot traité.



Figure.9 : Immersion de l'extrémité inférieure de la queue dans un bain d'eau à 55 °C

II.3.5.2. L'évaluation de l'effet analgésique périphérique (test de torsion)

II.3.5.2.1. Principe

Il consiste à vérifier l'action inhibitrice des extraits sur la douleur provoquée chez les souris par l'injection intra-péritonéale d'une solution diluée d'acide acétique. La méthode décrite par Alli *et al.*, (2014) a été utilisée pour observer les contorsions de constriction abdominale résultantes de cette injection.

II.3.5.2.2. Protocole

Les animaux ont été répartis au hasard en lots de quatre souris des deux sexes (30-40g) chacun

✓ Un lot témoin recevant par voie orale 0.1mL de l'eau physiologique servant de contrôle négatif.

✓ Trois lots expérimentaux de 4 souris chacun recevant par voie orale l'extrait éthanolique étudié à la dose de 250-1000g/Kg de masse corporelle.

✓ Deux lots de 4 souris ont reçu par la même voie le diclofenac sodique (100mg/kg), le standard combiné avec l'extrait éthanolique à la dose de 1000mg/kg de masse corporelle (Subhan *et al.*, 2008 ; Rai *et al.*, 2016).

30 minutes après les différents traitements, une injection d'une solution fraîche à 1% d'acide acétique (1 % P/v dans l'eau physiologique; pH = 2.7; 10mL/kg. Masse corporelle) a été faite dans le péritoine de chaque souris (Alli *et al.*, 2014). Le syndrome douloureux se caractérise par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale. Les animaux ont été alors placés individuellement dans une boîte en plastique transparente (Fig.10). Le nombre de torsions de chaque souris a été compté 10 minutes après l'injection de la solution d'acide acétique sur une période de 20 minutes (Tesema et Makonnen, 2015). La substance analgésique provoque une diminution significative de ces contorsions.

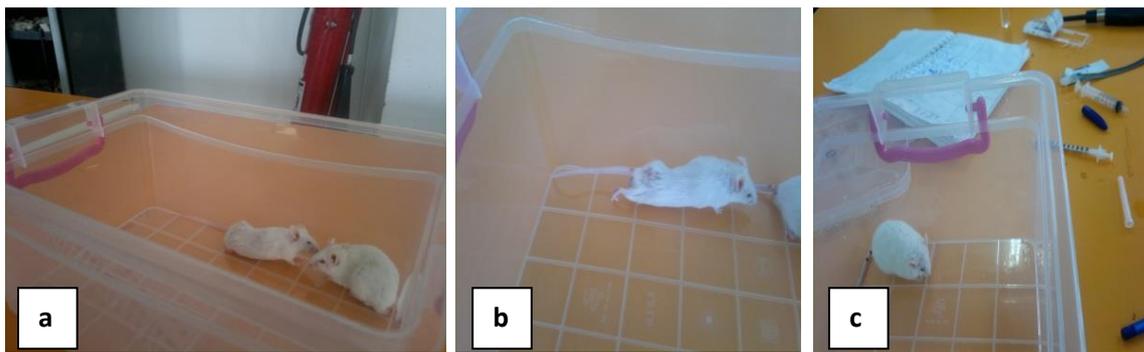


Figure.10 : (a et b) : Etirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale, (c) : Absence de torsion

L'activité antalgique est exprimée en pourcentage d'inhibition de la douleur pour chaque groupe traité par l'extrait, le diclofenac de sodium et l'eau physiologique.

Le calcul du pourcentage d'inhibition exprimé en moyenne \pm SEM des contorsions induite par l'injection de l'acide acétique se fait selon la formule suivante :

$$\text{PIC}(\%) = \frac{M2 - M1}{M1} \times 100 \quad (\text{Kouakou } et al., 2010).$$

PIC : Pourcentage d'inhibition des contorsions.

M1: Moyenne des contorsions du lot témoin.

M2 : Moyenne des contorsions du lot traité.

II.3.5.3. Statistique

Les données expérimentales ont été exprimées en moyenne \pm SEM, l'importance de la différence parmi divers groupes traités et le groupe témoin ont été analysés par le test ANOVA suivi par le test de comparaison multiple de Dunnett utilisant le Graph pad. Le niveau de signification a été fixé à $p < 0,05$ $n=4$ représente le nombre de souris par groupe

II.3.6. Evaluation de l'activité anti-hyperglycémiant *in vitro*

II.3.6.1. L'effet de l'extrait aqueux d'*H. stoechas* sur l'activité d' α -amylase

II.3.6.1.1. Introduction

Dans cette étude on a utilisé un modèle *in vitro* d'inhibition d' α -amylase pour cribler les extraits de la plante et évaluer leurs effets hypoglycémiques. La méthode d'essai biologique est décrite par Daksha *et al.* (2013) basée sur le test de coloration (l'amidon-iodé) avec une légère modification.

Les solutions d'amidon de pomme de terre, d' α -amylase, médicamenteuse et les extraits aqueux ont été préparées dans un Tampon en acétate (820,3 mg d'acétate de sodium et 18,7 mg de chlorure de sodium dans 100 mL d'eau distillée) (Ramanathan *et al.*, 2014).

II.3.6.1.2. Solution d' α -amylase

La solution enzymatique a été préparée en mélangeant 27.5g d'amylase salivaire dans 100mL de la solution de tampon phosphate (Sampath *et al.*, 2014). La salive est recueillie auprès des individus sains le matin, 2 heures après le petit déjeuner après que le volontaire se soit brossé les dents. Pour favoriser la salivation, le volontaire doit boire un verre d'eau 15 minute avant le prélèvement, 20 mL de salive totale sont prélevés dans des tubes stériles (Malathi *et al.*, 2013). Ces échantillons salivaires sont ensuite centrifugés à 14,000xg pendant 15 minutes à 4°C afin d'éliminer les mucines et les débris cellulaire et alimentaire. (Gouveia *et al.*, 2013). Le surnageant est pesé et dilué (100x) dans solution de tampon d'acetate (0,1M, pH 7) (Alvarez *et al.*, 2016).

II.3.6.1.3. Préparation de la solution d'amidon

Pour obtenir une solution d'amidon (0.1% p/v) en doit agiter 0.1 d'amidon de pomme de terre dans 100 mL de tampon d'acétate (0.1M, pH 7.2) (Sampath *et al.*, 2014).

II.3.6.1.4. Préparation de réactif colorimétrique

Indicateur iodine - iodure est préparé en mélangeant une solution de 5 mM de I₂ et 5mM de KI dans 250 mL de tampon d'acétate. Le réactif iodé obtenu doit être conservé à l'abri de la lumière (Ashok *et al.*, 2011).

II.3.6.1.5. Préparation des concentrations de l'extrait d' *Helichrysum stoechas*

Les différentes concentrations de l'extrait aqueux obtenu par décoction sont préparées dans la solution tampon d'acétate (0.1M, pH 7.2) afin d'évaluer leur effet sur l'activité enzymatique de l' α amylase. Les concentrations finales utilisées sont : 0.050 ; 0,1 ; 0,250 ; 0,5 ; 0,750 et 1 mg/mL

II.3.6.1.6. Méthode

A 1 mL de solution d'essai (médicament metformine/ extrait aqueux) de concentration allant de 50-1000 μ g/mL on a ajouté 1 mL de la solution d' α amylase tamponné dans des tubes à essai individuels le contenu a été incubé à 37°C pendant une période de 10 minute (Jabir *et al.*, 2014).

Après incubation, 1mL d'amidon tamponné à 0,1% et 2mL de tampon d'acétate (0.1M, pH 7.2) ont été ajoutés et le mélange a été ré-incubé pendant 1 heure à température ambiante (Ramanathan *et al.*, 2014 ; Salvi, 2017).

La réaction enzymatique a été arrêtée en ajoutant du HCl 1M (20 μ l) et 100 μ l de réactif iodé (Ashok *et al.*, 2011). Le changement de couleur a été noté (Fig. 11). Une couleur bleu foncé indique la présence d'amidon, une couleur jaune indique l'absence d'amidon et tandis qu'une couleur brunâtre indique l'amidon partiellement dégradé dans le mélange réactionnel. En présence d'inhibiteurs des extraits, l'amidon ajouté au mélange de dosage enzymatique n'est pas dégradé et donne un complexe de couleurs bleu foncé, alors que en l'absence de l'inhibiteur, le complexe de couleur jaune est développé indiquant que l'amidon est complètement hydrolysé par l' α -amylase. L'absorbance a été lue à 565 nm en utilisant un spectrophotomètre (Jijith et Jayakumari, 2017). Le médicament antidiabétique inhibiteur de α -amylase et β glucosidase est la metformine a été utilisé comme standard positif (Ferosekhan *et al.*, 2016). Le contrôle négatif représentant 100% d'activité enzymatique sans extrait végétale qui était remplacé par une quantité égale de tampon d'acétate (0.1M, pH 7.2). Pour éliminer l'absorbance produite par l'extrait de plante des contrôles blancs d'extrait sans enzyme ont également été enregistrés (Prakash *et al.*, 2017). La propriété antidiabétique de l'extrait a été

déterminé par l'inhibition de α amylase qui a été exprimée en pourcentage d'inhibition et calculer par équation suivante

(%) Inhibition = $(\text{Abs de l'échantillon} - \text{Abs de contrôle} / \text{Abs de l'échantillon}) * 100$
(Ramanathan *et al.*, 2014).

L'Abs contrôle est l'absorbance de la réaction témoin (contenant tous les réactifs à l'exception de l'échantillon d'essai) et l' Abs échantillon est l'absorbance de l'échantillon à tester

La valeur IC_{50} est définie comme la concentration d'extrait nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de l'enzyme, celle-ci a été déterminé par graphe en utilisant le pourcentage d'inhibition de six concentrations différentes des extraits (Kazeem *et al.*, 2013).

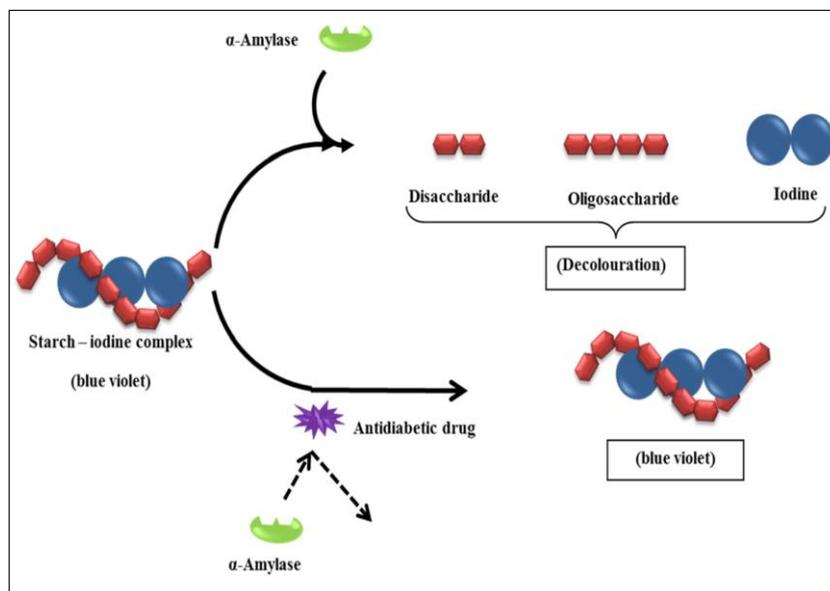


Figure.11 : Activité anti-hyperglycémique *in vitro* par test d'amidon-iodure (Jijith et Jayakumari, 2017).

II.3.6.2. L'effet des extraits aqueux sur l'absorption de glucose par la levure

II.3.6.2.1. Introduction

La caractéristique du système de transport de sucre dans la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) a reçu une attention importante dans plusieurs laboratoires. Les levures peuvent utiliser un ou plusieurs sucres comme principale source de carbone et d'énergie. La levure convertit ce sucre en éthanol. L'absorption de glucose par la cellule de levure est un outil important pour l'évaluation de la propriété antidiabétique des composés à base de plantes ou synthétiques.

La figure .12 montre une représentation schématique d'absorption de glucose par cellule de levure. L'activité antidiabétique de l'extrait aqueux d'*Helichrysum stoechas* a été étudiée par absorption de glucose dans une cellule de levure.

II.3.6.2.2. Méthode

La levure commerciale de boulanger (1 g) a été suspendue dans de l'eau distillée (5 mL) et lavée par centrifugation répétée (3000 xg, 15 min) jusqu'à ce que le liquide surnageant soit limpide. Une suspension de 10% (V/V) a été préparée dans de l'eau distillée (Pitthaipillai et Ponniah, 2016). Les différentes concentrations de l'extrait aqueux d'*Helichrysum stoechas* ont été ajoutées à 1 mL de solution de glucose (5, 10 et 20mM) et incubées ensemble pendant 10 minutes 37°C. La réaction a été commencée en ajoutant 100 µl de suspension de levure, agité et incubée à 37 °C pendant 60 min. Après 1heure, les tubes ont été centrifugés (2 500 x g, 5 min) et le glucose a été estimé dans le surnageant par le réactif iodé (Sinha *et al.*, 2013). La metformine a été prise comme médicament standard (Dinesha *et al.*, 2015).

Le pourcentage d'inhibition de l'absorption de glucose par la levure a été calculé en utilisant la formule suivante:

Augmentation de l'absorption de glucose (%) = $(Abs_{(E)} - Abs_{(C)}) / Abs_{(C)} \times 100$ (Tchamgoue *et al.*, 2016 ; Nair *et al.*, 2013) ; où, $Abs_{(E)}$ est l'absorbance de l'échantillon d'essai et $Abs_{(C)}$ est l'absorbance de la réaction témoin (contenant tous les réactifs à l'exception de l'échantillon d'essai). Toutes les expériences ont été réalisées en trois exemplaires.

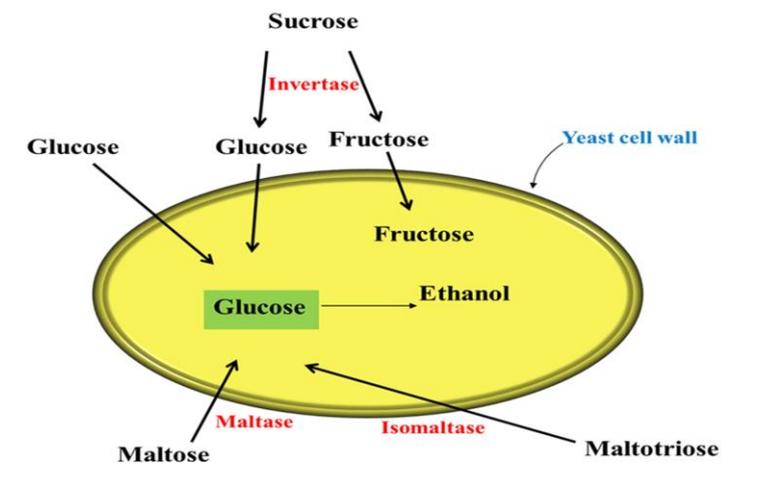


Figure.12: L'absorption de glucose par la levure (Jijith et Jayakumari, 2017).

II.3.6.3. La glycosylation non-enzymatique d'hémoglobine

II.3.6.3.1. Introduction

La glycation est la base moléculaire clé de plusieurs complications diabétique comme la rétinopathie diabétique, la néphropathie, la neuropathie et certaines maladies cardio-vasculaires. Les complications du diabète sont dominantes, causes de la mortalité chez les patients diabétiques. L'objectif de la gestion du diabète est la prévention de ces complications et, par conséquent, le diagnostic de la maladie à un stade précoce.

Le taux de glucose plasmatique n'est pas un paramètre approprié pour le contrôle de la glycémie à long terme, car il fluctue largement pendant une journée.

L'hémoglobine glyquée est utilisée à la fois comme indice de la glycémie moyenne et comme mesure du risque pour le développement de complications du diabète. HbA1c est le principal composant de l'hémoglobine glyquée, qui est formé par un processus non enzymatique irréversible de combinaison de groupe aldéhyde de glucose avec la valine amino-terminale de la chaîne β de l'hémoglobine. Ce procédé comprend une séquence de réactions non enzymatiques (Fig.13). La première est rapide mais réversible, formation d'une aldimine (ou base de Schiff), la suivante est la formation considérablement plus lente d'une cétoamine stable via un processus connu sous le nom de réarrangement Amadori. La cétoamine s'accumule sur la vie des érythrocytes et forme la principale partie de l'hémoglobine glyquée. L'étape suivante de la réaction est la formation produit finis de la glycation à l'hémoglobine. Le taux de la formation d'hémoglobine glyquée est proportionnelle à la concentration sanguine libre de glucose, chaque augmentation de 1% de HbA1c (la Composante majeure de l'hémoglobine glyquée) correspond à une augmentation moyenne de 35 mg / dl (1,95 mmol / l) du glucose plasmatique. (Olga *et al.*, 2007).

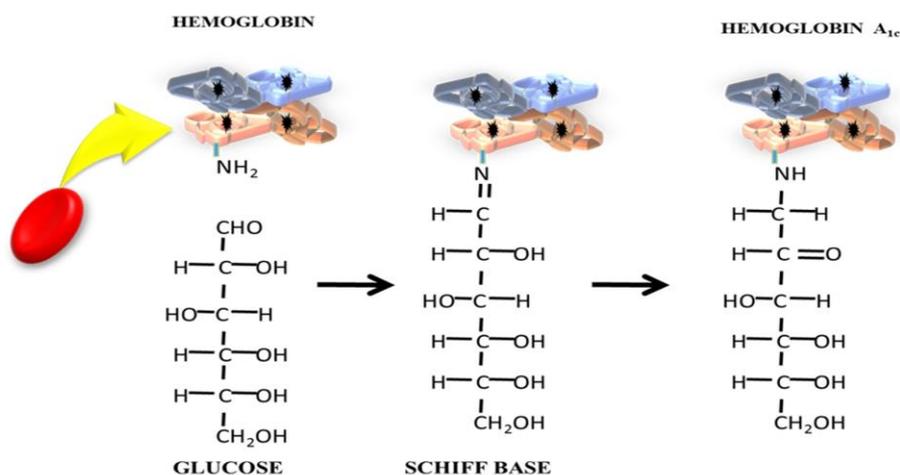


Figure.13 : Glycosylation d'hémoglobine (Jijith et Jayakumari, 2017).

Les antiglycations et les antioxydants dérivés des végétaux sont très importants dans la prévention de la complication diabétique. L'activité Antidiabétique de feuilles de *H. stoechas* est déterminée en estimant le degré de la glycosylation non-enzymatique d'hémoglobine, mesuré par colorimétrie.

II.3.6.3.2. Préparation d'hémoglobine

Le sang a été prélevé sur un humain volontaire sain (5mL) et transféré dans un tube contenant

un anticoagulant et centrifugé à 1500 tpm pendant 10min, le plasma est éliminé et les cellules sont récupérées dans un tube à essai. L'hémolysât a été préparé sur la base du principe de la lyse hypotonique. Les globules rouges collectés ont été lavés trois fois avec une solution de NaCl à 0,14M et un volume de suspension de globules rouges a été lysé avec deux volumes de tampon phosphate 0,01 M, pH 7,4 et 0,5 volume de CCl₄ (tétrachlorure de carbone). L'hémolysât a ensuite été débarrassé des débris par centrifugation 2300tpm pendant 15 min à température ambiante. La fraction riche en hémoglobine à savoir la couche supérieure a été séparée et placée dans le tube d'échantillon et réfrigéré pour le stockage jusqu'à utilisation (Singh *et al.*, 2016).

II.3-6.3.3. Détermination des conditions pour la glycosylation de l'hémoglobine

Afin de trouver la meilleure concentration de glucose et le temps le plus utile pour la glycosylation, l'hémoglobine a été incubé avec différentes concentrations de glucose et à différents moments. La quantité de glycosylation a été mesurée par méthode colorimétrie.

1 mL de solution d'hémoglobine 5 g /100 mL et 1 mL de solution contenant du glucose à différentes concentrations (0,2, 1, 2g / 100 mL) et gentamicine 20mg /100 mL dans un tampon phosphate 0,01 M, pH 7,4 ont été incubés dans l'obscurité à température ambiante et à différents moments (4, 48, 72hrs). Le degré de glycosylation de l'hémoglobine est mesuré par spectrophotomètre à 520 nm. L'essai a été réalisé en triple exemplaire (Pal *et al.*, 2010).

II.3.6.3.4. L'effet des extraits aqueux sur la glycosylation d'hémoglobine

Le mélange réactionnel (4 mL) est composé d'une solution d'hémoglobine, et de gentamycine (0.02%) et de l'extrait aqueux de *H. stoechas* à différentes concentrations (50-1000 µg/mL), les solutions ont été préparées dans un tampon phosphate 0.01 M. pH 7.4. La réaction a été déclenchée par addition de 1 mL de glucose à 2% dans un tampon phosphate 0,01 M (pH 7.4). Le mélange a été incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 72 heures. Le degré de glycosylation de l'hémoglobine est mesuré par spectrophotomètre à 520 nm (Pal *et al.*, 2010).

La metformine a été utilisée comme médicament standard (Abirami *et al.*, 2014).

L'essai a été réalisé en triple exemplaire et le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$(\%) \text{ Inhibition} = (\text{Abs}_{\text{test}} - \text{Abs}_{\text{contrôle}} / \text{Abs}_{\text{test}}) * 100 \text{ (Abirami } et al., 2014)$$

L'Abs_{contrôle} est l'absorbance de la réaction témoin (contenant tous les réactifs à l'exception de l'échantillon d'essai) et l'Abs_{test} est l'absorbance de l'échantillon à tester.

II.3.6.4. Analyses statistique : Toutes les déterminations ont été réalisées en triple exemplaire et les données ont été analysées par ANOVA suivie d'une multiple comparaison de Tukey, tester les différences significatives en utilisant graph pad. Les valeurs ont été considérées significatives à $p \leq 0,05$.

II.3.7. Evaluation de l'activité anti-hyperglycémiant *in vivo*

II.3.7.1. Introduction

Dans le but d'étudier l'activité antidiabétique *in vivo* de l'extrait aqueux d'*Helihrysum stoechas*, préparés par décoction, nous avons utilisé des souris blancs albinos (26-38g) repartis entre des souris normaux (non diabétiques) et des souris rendus diabétiques par l'alloxane (120 mg/mL) (diabète expérimental), et nous avons envisagé trois procédures : test à court terme, test de tolérance orale au glucose et test à long terme.

II.3.7.2. Matériel animal

Les souris sont placés aléatoirement en groupes de trois (03) dans des cages standards pour une période d'acclimatation de 02 semaines avant d'être soumis aux différentes procédures expérimentales. Pendant cette période, les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture de bétail fourni par l'office national de l'aliment de bétail (ONAB) et sont maintenus dans une animalerie à température constante 22 °C et soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. Les différentes expériences ont toujours lieu le matin à 8 heures.

II.3.7.3. Matériel végétal

Une quantité de 10 g du matériel végétal broyé est mise à bouillir pendant 15 minutes dans 100 mL d'eau distillée. Après filtration sur Büchner, les filtrats ont été ensuite concentrés et séchés dans l'étuve et nommés Aqueux décoction (Aq_(D)) puis conservée à 4°C pour les travaux ultérieurs.

II.3.7.4. L'étude à court terme chez les souris non diabétiques

II.3.7.4.1. L'essai chez les souris normo-glycémiques

Afin de déterminer l'effet antidiabétique de l'extrait aqueux décocté la glycémie des souris de différents lots est suivie pendant 6 heures après gavage (Birru *et al.*, 2015) (Fig. 14).

Lots expérimentaux :

Les souris sont réparties en plusieurs lots de 3 souris chacun.

- ✓ Lot1 : normaux témoins recevant du l'eau physiologique
- ✓ Lot2 : normaux traités par 250 mg/kg d'extrait aqueux.
- ✓ Lot3 : normaux traités par 500 mg/kg d'extrait aqueux.
- ✓ Lot4 : normaux traités par 1000 mg/kg d'extrait aqueux.
- ✓ Lot5 : normaux traités par 250 mg/kg de Metformine
- ✓ Lot6 : normaux traités par 1000 mg/kg d'extrait aqueux+ Metformine (250 mg/kg)

II.3.7.4.2. Test de tolérance orale au glucose (TTOG)

Afin d'évaluer l'effet antidiabétique de l'extrait aqueux de l'*H. stoechas*, les souris des différents lots cités précédemment sont soumises à un test de tolérance au glucose réalisé par gavage d'une solution de glucose à raison de 2g/kg du poids corporel (Tamiru *et al.*, 2012). Des prélèvements sanguins pré et post ingestion sont, ensuite, réalisés à t_0 (basal), t_1 (60 mn), t_2 (120 mn), t_4 (240 mn), t_6 (360 mn) pour mesurer la glycémie chez tous les lots cités auparavant (Aslan *et al.*, 2007).

II.3.7.5. Induction du diabète chez les souris

Le diabète permanent a été provoqué par l'administration de monohydrate d'alloxane par voie sous cutanée à dose de 120 mg/kg de PC (Sharma *et al.*, 2010).

Alloxane (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine;2,4,5,6-pyrimidinetetrone) est un dérivé oxygéné de la pyrimidine est un analogue du glucose toxique détruit sélectivement les cellules cellule bêta du pancréas productrices d'insuline, lorsqu'il est administré à des rongeurs et de nombreuses autres espèces animales. Cela provoque un diabète sucré appelé (diabète alloxonique) chez ces animaux, avec caractéristiques similaires au diabète de type 1 chez l'homme (Rohilla et Ali, 2012 ; Al-awar *et al.*, 2016).

La solution de l'alloxane est préparée dans l'eau physiologique à raison de 120 mg/kg. Du fait de son instabilité en solution ainsi qu'à température ambiante, elle doit être préparée juste avant l'injection. L'injection se fait à jeun par voie intra péritonéale. Après administration de

l'alloxane et pour prévenir son effet fatal, les biberons sont remplis de solution de saccharose à 8% pendant 24 heures. Après 03 jours, le diabète expérimental est confirmé chez les souris en mesurant la glycémie à l'aide d'un glucomètre. Les souris qui ont un taux de glucose sanguin \geq à 2 g/l sont utilisées dans l'expérimentation à courte et longue durée. Les souris qui n'ont pas montré de condition diabétique au troisième jour ont été exclus de l'expérience. (Issa et Bule, 2015).

II.3.7.5.1. l'étude à court terme chez les souris diabétiques

Des souris diabétiques et des souris normaux ont été mis à un jeun pendant seize (16) heures. Le poids des souris a été déterminé le jour même de l'expérience, avant l'administration de l'extrait à tester. L'extrait et la substance de référence sont dissous dans une solution de sérum physiologique (NaCl à 9 g/l), puis administrés aux souris par voie orale. La glycémie de toutes les souris a été mesurée à 0 min (avant le gavage), 60, 120, 240 et 360 min (Syiem *et al.*, 2010 ; Syiem et Warjri, 2011).

Les souris sont réparties en sept lots de 3 souris chacun.

- ✓ Lot1 : normaux témoins recevant du l'eau physiologique.
- ✓ Lot2 : diabétiques témoins recevant du l'eau physiologique.
- ✓ Lot3 : diabétiques traités par 250 mg/kg d'extrait aqueux.
- ✓ Lot4 : diabétiques traités par 500 mg/kg d'extrait aqueux.
- ✓ Lot5 : diabétiques traités par 1000 mg/kg d'extrait aqueux.
- ✓ Lot6 : diabétiques traités par 250 mg/kg de Metformin.
- ✓ Lot7: diabétiques traités par 1000 mg/kg d'extrait aqueux+ 250 mg/kg médicament.

II.3.7.5.2.L'étude à long terme

Les différents traitements cités précédemment ont été donnés aux souris selon le type de lots quotidiennement le matin pendant 10jours. La glycémie à jeun des souris a été mesurée sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale des animaux chaque 2 jour à l'aide d'un lecteur de glucose (Glucomètre à bandelettes réactives Contour plus) après 3 heures de l'administration orale de l'extrait (Michael *et al.*, 2010). Les teneurs en glucose sont exprimées en mg/dl et les variations de la glycémie sont exprimées en pourcentage (%) par rapport à la glycémie basale et calculée comme suit:

Pourcentage de variation de glycémie (%)= $G_t - G_0 \times 100 / G_0$

Pourcentage de variation de poids (%)= $P_t - P_0 \times 100 / P_0$

G_0 : glycémie basale (temps 0 min). G_t : glycémie à temps t.

P_0 : poids à temps 0 min. P_t : poids à temps t.



Figure.14 : (a) : prélèvement de sang caudale, (b) : Glucomètre, (c) : balance en gramme (g)

Afin de déterminer l'influence de l'extrait aqueux sur la croissance de nos souris, nous avons suivi l'évolution du poids corporel chez les souris normaux témoins et expérimentaux pendant tous les jours après l'administration orale. Le poids est mesuré à l'aide d'une balance en gramme (g) (Fig.14). L'évolution du poids corporel exprimée en variation (gain ou perte) durant la période de l'expérience, a été exprimée en g / 3J.

II.3.7.6. Analyse statistique

Les calculs statistiques ont été effectués sous forme de moyenne \pm SEM. Des comparaisons de groupe ont été exécutées par l'analyse de variance ANOVA à l'aide du logiciel Graph Pad Prism Version 6.05. La différence significative entre le groupe contrôle et les groupes expérimentaux a été évaluée par le test t de Student.

Partie III. Résultats et discussion

III.1. Les rendements des extractions

Les méthodes d'extraction ont permis d'obtenir cinq extraits bruts; trois extraits éthanoliques, (EtOH_(D)), (EtOH_(M)) et Soxhlet EtOH(s), et deux extraits aqueux, (Aq_(D)) et (Aq_(M)).

Afin d'évaluer la meilleure technique d'extraction de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins condensés ont a utilisé trois méthodes d'extraction à savoir la décoction et la macération avec deux solvants (eau, éthanol) et le Soxhlet (éthanol). Les meilleurs rendements d'extraction sont enregistrés par la décoction et le Soxhlet soit une moyenne de 10,776% et 12,25 % respectivement par rapport au 8,64 % pour la macération (Tab.3)

La méthode de Soxhlet a donné un rendement plus élevé par rapport à d'autres méthodes d'extraction. L'utilisation combinée d'eau et de l'éthanol peut faciliter l'extraction des substances solubles dans l'eau et / ou les solvants organiques. Cela peut être la raison pour laquelle les rendements de l'hydro-alcoolique sont plus élevés que les rendements en eau.

Le rendement calculé par Carini *et al.*, (2001) à partir d'un extrait éthanolique d'*Helichrysum stoechas* est de 11%. Les extraits méthanoliques de 16 plantes originaires de la Turquie et appartenant au genre *Helichrysum*, étudiés par Albayrak et ces collaborateurs (2010a) ont donné des rendements qui varient entre le 13% et 32%, dont celui d'*Helichrysum stoechas subsp barellieri* est de 16.87%. Ces rendements sont supérieurs par rapport à ceux que nous avons trouvés. Cette variabilité de rendement dépend de plusieurs paramètres tels que: le solvant, le pH, la température, le temps et la méthode d'extraction ainsi que le lieu et la période de la récolte de l'échantillon (Do *et al.*, 2014).

Tableau.3 : Le rendement de différents extraits de *Helichrysum stoechas*

Méthode d'extraction	Solvant	Aspect	Couleur	Rendement (%)
Décoction	Ethanol	Visqueux	Vert foncé	10,776
	Eau	Visqueux	Marron	9,837
Macération	Ethanol	Visqueux	Vert foncé	8,656
	Eau	Visqueux	Marron	8,06
Soxhlet	Ethanol	Visqueux	Vert foncé	12,25

III.2. Criblage phytochimique

III.2.1. Réactions de caractérisation

L'étude phytochimique réalisé sur la plante indique la présence est riche en différents types de flavonoïdes. Ces composés se sont confirmés par l'apparition des colorations orange et rose. Les colorations rose, orange et rouge violacé indiquent la présence des flavonols, flavones et

flavanones (N'guessan *et al.*, 2009), tannins, de coumarines, les saponines qui sont illustrée par un indice de mousse très marqué ainsi que les alcaloïdes (Tab.4).

Nos résultats de l'étude phytochimique d'*Helichrysum stoechas* sont en accord avec ceux trouvés dans la bibliographie, et qui mentionnent la richesse d'*Helichrysum stoechas* en polyphénols, en stérols et en fractions triterpéniques, en acides phénoliques, flavonoïdes et coumarines (Carini *et al.*, (2001) ; Lourens *et al.*, 2004). Cette richesse en principes actifs confère à la plante des propriétés remarquables qui pourraient justifier son utilisation en médecine traditionnelle.

Tableau.4 : Criblage phytochimique de l'Infusion de *Helichrysum stoechas*

<i>Helichrysum stoechas</i>		Tiges feuillues	Fleurs
Flavonoïdes		Rose +	orange rouge +
Polyphénol et tanins		Vert +	Bleu Noir +
Alcaloïdes	Mayer	Trouble et précipité +	Trouble et précipité +
	Dragendorff	Trouble et précipité +	Trouble et précipité +
Stérols et triterpènes		vert violet + Hétérosides tèrpénique	Verte bleu + Hétérosides Stéroïdiques
Saponosides		+	+
Coumarines		+	+

III.2.2. Criblage qualitatif par CCM

C'est la chromatographie sur couche mince (CCM) qui nous a permis de confirmer les résultats des réactions de caractérisations et de séparer les constituants chimiques contenus dans les extraits. Chaque constituant est caractérisé par son facteur de rétention (R_f). Le tableau 3 représente les informations sur les facteurs de rétentions (R_f), l'observation à l'UV (254 et 366nm) et les différentes colorations après la révélation par le réactif de Godin.

On a remarqué que les mêmes tâches observées avec le décocté éthanolique se retrouvent au niveau du macérât éthanolique et soxhelet. A 254 nm la plupart des constituants de nos extraits aqueux et alcooliques sont visibles et apparaissent sous forme de taches noires. A 366 nm les tâches apparaissent en bleue indique la présence de coumarines. Après révélation avec le réactif de Godin, les taches noires et blanches sont colorées en brune, gris noirâtre et jaune. (Tab.5).

Tableau.5 : Valeurs des R_f des échantillons de différents extraits de *Helichrysum stoechas* et les témoins.

Extraits / Témoins	R _f	Observation à 254 nm	fluorescence à 366 nm	Réactif de Godin
Quercétine	0,98	-	Jaune	Jaune
Ac gallique	0,94	-	Brune	Brune
Ac. Ascorbique	0,71	Visible	Brune	Brune
EtOH_(D)	/ 0,98	-	Jaune	Jaune
EtOH_(M)//	0,94	-	-	Brune
	0,90	-	Jaune	-
	0,86	Visible	Jaune	-
	0,82	Visible	Blanche	-
	0,78	Visible	Brune	Brune
	0,74	Visible	Bleue	-
	0,64	-	Bleu-verte	-
	0,51	-	Bleue	Grise
	0,37	-	-	Grise
Aq_(D)	0,86	-	Jaune	-
	0,78	-	Brune	-
	0,71	visible	Brune	-
	0,63	-	Jaune	-
Aq_(M) / Aq_(D)	0,82	Visible	Blanche	-
	0,74	Visible	Bleue	-
EtOH_(S)	0,98	-	Jaune	Jaune
	0,94	-	-	Brune
	0,90	-	Jaune	-
	0,86	Visible	Jaune	-
	0,82	Visible	Vert	-
	0,80	Visible	maron	maron
	0,71	Visible	Bleue clair	brune
	0,69	-	Bleu-verte	-

Les tâches de couleur grise nous orientent vers la présence de tanins. Les colorations jaunes obtenue au R_f 0,98, 0,90 et 0,86 peuvent être celle des flavonoïdes (Bekro.Mamyrbekova *et al.*, 2013). Par calcul des rapports frontaux des différents extraits et leur comparaison avec ceux des témoins, les composés suivants ont été identifiés : L'acide gallique, la quercétine, dans les extraits EtOH_(D) et EtOH_(M) et EtOH_(S) et l'acide ascorbique dans l'extrait Aq_(D) et EtOH_(S).

III.3. Analyses quantitatives de polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins

Le contenu phénolique total des extraits, comme estimée par la méthode du réactif de Folin-Ciocalteu a été déterminée à partir d'une droite d'étalonnage, tracée en utilisant comme standard l'acide gallique $y = 0,001x - 0,009$ et $R^2 = 0,995$ et exprimée en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG} / \text{mg d'extrait}$). La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage ($y = 0,039x + 0,050$) et $R^2 = 0,994$ et réalisée par la quercétine à différentes concentrations (0-40 $\mu\text{g/mL}$) (Annexe 1 : Fig. 1 et 2).

L'étude statistique des teneurs en polyphénols totaux obtenus par les différentes méthodes d'extraction (Fig.15, Tab.6), révèle une différence significative ($p < 0,05$) pour la majorité des extraits, toutefois la décoction semble être la meilleure méthode d'extraction des polyphénols totaux soit en moyenne 262,22 contre 188,74 $\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait sec pour la macération

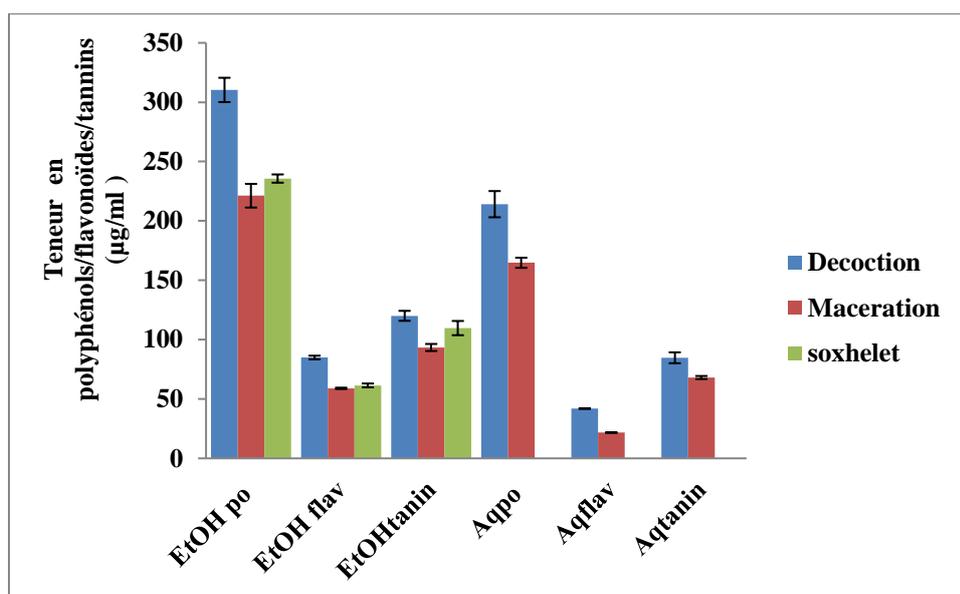
Tableau.6 : Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tannins

Methode d'extraction	solvant/ extraits	polyphénols ($\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait)	flavonoïdes ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait)	Tanin ($\mu\text{g EAT}/\text{mg}$ d'extrait)
Décoction	Ethanol EtOH _(D)	310,337 \pm 10,239 ^c	84,941 \pm 1,54 ^c	120,07 \pm 4,198
	Eaux. Aq _(D)	214,103 \pm 11,046 ^a	41,914 \pm 0,296 ^c	84,73 \pm 4,574
Macération	Ethanol EtOH _(M)	221,23 \pm 9,966 ^c	58,974 \pm 0,571 ^c	93,40 \pm 2,974
	Eaux Aq _(M)	164,744 \pm 4,249 ^a	21,726 \pm 0,267 ^c	68,07 \pm 1,312
Moyenne \pm sem (décoction)	EtOH _(D) - Aq _(D)	262,220 \pm 48,117 ^c	63,428 \pm 21,514 ^c	102,4 \pm 17,67
Moyenne \pm sem (Macération)	EtOH _(M) -Aq _(M)	192,987 \pm 28,245 ^b	40,350 \pm 18,624 ^c	80,735 \pm 12,665
Soxhelet	Ethanol EtOH _(S)	235,67 \pm 3,480	61,45 \pm 1,62	109,733 \pm 5,99

Les valeurs de probabilité $P < 0,05$ ont été considérées comme significatives. a : peu significative, b : significative, c : très significative. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM (n = 3)

La méthode d'extraction par soxhelet en présence de l'éthanol donne un rendement important en polyphénol par rapport à la macération aqueuse ou éthanolique. Par ailleurs, les extraits éthanoliques enregistrent des teneurs moyen en polyphénols totaux plus élevées (265,786 $\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait sec) que les extraits aqueux (185,17 $\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait). Cela peut être dû au fait que les composés phénoliques sont souvent extrait en quantités plus élevées dans des solvants plus polaires tels que le solvant hydro éthanolique (Sultana *et al.*, 2009)

Les résultats de la teneur en flavonoïdes des décoctés et des macérâts par les deux solvants (Fig.15) montrent que la décoction est préférable pour extraire les flavonoïdes à savoir une moyenne de 63,428 $\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait contre 40,350 $\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait en moyenne pour la macération. L'extraction par soxhelet et la décoction reste les meilleures méthodes pour avoir les flavonoïdes.



Tous les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne \pm SEM ($n = 3$).

Figure.15 : Evaluation des polyphénols totaux, flavonoïdes et les tannins des différents extraits de *H. stoechas*

En ce qui concerne le solvant d'extraction, quel que soit le mode d'extraction, l'éthanol reste le meilleur solvant d'extracteur des flavonoïdes soit en moyenne $71,957 \mu\text{g EQ/ mg}$ d'extrait éthanoliques contre $31,821 \mu\text{g EQ/ mg}$ d'extrait aqueux. Statistiquement la différence entre les teneurs en flavonoïdes en fonction de la méthode d'extraction utilisée est hautement significative

La teneur en tanin a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage ($y = 0,0001x + 0,024$) et $R^2 = 0,995$, réalisée par l'acide tannique à différentes concentrations ($0-1000 \mu\text{g/mL}$) (Annexe 1 : Fig. 3). Les quantités de tanins pour tous les extraits sont plus importantes que les flavonoïdes.

Il a été signalé que les tanins condensés possèdent diverses activités biologiques, telles que l'activité antioxydante, ils sont employés pour leurs propriétés astringentes comme anti diarrhéiques, vasoconstricteurs, hémostatiques et surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes (Ashok et Upadhyaya, 2012). Ils sont connus pour leur utilité dans le traitement des tissus enflammés ou ulcérés et ils ont une activité remarquable dans la prévention du cancer (Yıldırım et Kutlu, 2015). De plus, des effets antiprolifératifs modérés de *H. stoechas* ont également été observés dans des cellules cancéreuses cervicales (HeLa) par Les *et al.* (2017). Cette activité antiproliférative pourrait suggérer des propriétés

anticancérogènes de *H. stoechas* selon d'autres études (Eroğlu *et al.*, 2009). Ainsi, *H. stoechas* peut constituer une source potentielle de composés bioactifs dans le traitement du cancer.

III.4. Activité antioxydante

III.4.1. La méthode de piégeage du radical libre DPPH*

Les profils de l'activité anti radicalaire obtenus ont été testés par la méthode du DPPH, c'est un radical organique stable réagit avec le polyphénol par transfert d'électrons et d'atome d'hydrogène. Les antioxydants réagissent avec le DPPH et neutralisent le radical. La couleur du mélange réactionnel change du violet au jaune. L'intensité de la décoloration mesure la potentialité d'activité du piégeage des antioxydants (Vladimir-Knežević *et al.*, 2011).

Les valeurs IC_{50} a été obtenues à partir du graphe tracé en fonction de pourcentage de l'inhibition de piégeage de DPPH et la concentration d'échantillon, cette valeur est nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. (Annexe : 2 ; Fig.4, Tab.1).

Les valeurs de IC_{50} révèlent que les extraits de *H. stoechas* possèdent une activité anti radicalaire dose dépendante. La majorité des extraits de la plante présentent des activités anti radicalaire nettement supérieurs à celle du produit de référence (BHT) (Tab.7 ; Fig.16).

Tableau.7 : La détermination de IC_{50} des activités antiradicalaires et antioxydantes des différents extraits de *H. stoechas* et les standards

Methode d'extraction	Extraits	IC_{50}^* ($\mu\text{g/mL}$)			Capacité antioxydante (mg AAE/g)
		DPPH	H202	FRAP	
Décoction	EtOH(D)	27,132±0,423 ^{ns}	96,965±0,575	123,686±1,029	90,437±0,257
	Aq(D)	32,313±0,429 ^{ns}	126,027±0,537	187,260±2,874	54,329±0,158
Macération	EtOH(M)	39,697±0,636 ^c	118,73±0,475	131,161±0,671	79,856±0,085
	Aq(M)	63,194 ± 3,017 ^c	158,773±1,483	216,921±2,998	40,594±0,208
Moyenne ± sem (décoction)	EtOH(D)- Aq(D)	29,723±2,590 ^c	72,383 ±18,054	155,473±31,785	111,496±14,531
Moyenne ± sem (Macération)	EtOH(M)-Aq(M)	51,446±11,749 ^c	60,225±19,631	174,041±42,880	138,752±20,022
Soxhelet	EtOH(S)	25,13±0,643	72,75±0,407	83,939±0,578	103,576±0,102
Standards	BHT	45.41±0.642 ^c	-	-	85,447±0,610
	A ascorbique	-	32,90±0,681	99,176±0,764	-
	A gallique	-	-	-	110,437±0,157

Valeur IC_{50} : Concentration qui inhibe 50% des radicaux DPPH et OH ; *E C_{50} : l'absorbance est de 0,5 pour réduire 50% des ions de fer. EAA: équivalent A.ascorbique. Les valeurs de probabilité $P < 0,05$ ont été considérées comme significatives. ns : non significative, a : peu significative, b : significative, c : très significative. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM (n = 3)

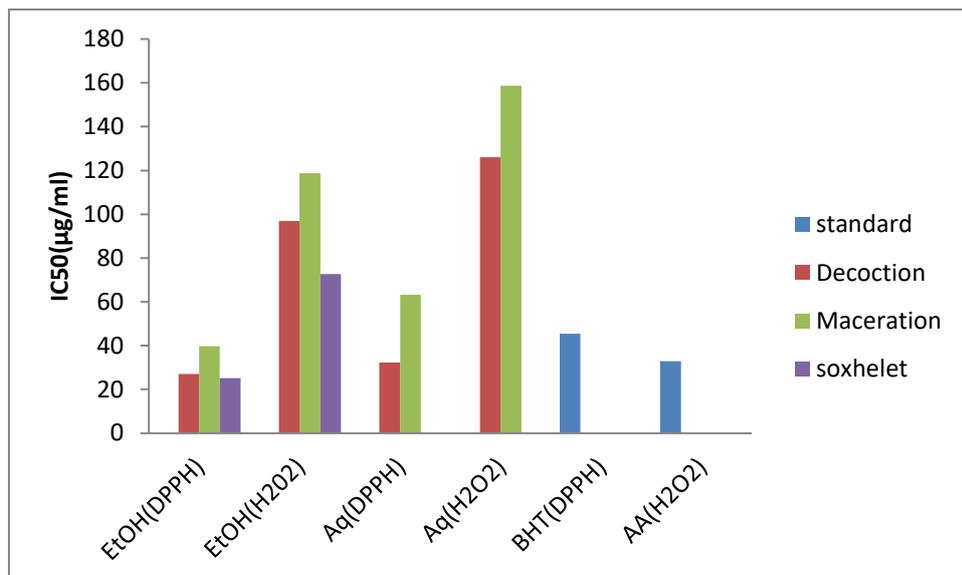


Figure.16 : Les valeurs IC_{50} ($\mu\text{g} / \text{mL}$) pour les extraits de *Helichrysum stoechas* et les standards déterminées par le test DPPH et la méthode du piégeage du peroxyde d'hydrogène.

Tous les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne \pm SEM ($n = 3$)

Les extraits hydro-alcoolique ont une activité antioxydante (DPPH) élevée dans tous les essais *in vitro* IC_{50} entre (27,132 et 39,697 $\mu\text{g} / \text{mL}$) par rapport aux extraits aqueux (valeurs de IC_{50} allant de 39,697 à 63,194 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Ceci est en accord avec les composés phénoliques de concentration élevée (265,786mg / g) présents dans l'extrait hydro-alcoolique par rapport aux extraits aqueux (185,17mg / g).

III.4.2. Pouvoir réducteur des extraits testés par la méthode FRAP

Le pouvoir réducteur des différents extraits était déterminé par la méthode d'Oyaizu (1986). Ce test implique la réduction de l'ion ferricyanure, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ à l'ion $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ par le don d'électrons de polyphénols. Les polyphénols sont oxydés dans cette réaction. Les ions ferrocyanure se combinent avec Fe (III) en milieu acide pour donner un complexe bleu de Prusse, c'est-à-dire un complexe de ferri-ferrocyanure, dont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm (Yıldırım *et al.*, 2001). L'intensité du complexe coloré augmente avec la capacité donneuse d'électrons de ses différents extraits.

Les résultats montrent qu'il y a eu une augmentation du pouvoir réducteur des extraits au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente (Tab. 8). L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation de la capacité réductrice. Ce qui est confirmé par plusieurs auteurs (Morales et Paredes, 2014 ; Keffous *et al.*, 2016).

Les résultats obtenus montrent que la capacité des extraits de réduire le fer est différente à celle de l'acide ascorbique (fig.7). Les valeurs d'absorbance pour les différents extraits et le standard testés à une concentration de 200 mg / mL déterminées dans ce test, variait de 0,09 à 0,922. Cette réduction est beaucoup plus importante dans les extraits hydro-alcooliques (DO = 0,922) que celle obtenus par les extraits aqueux (DO = 0,462). Ce résultat indique que les extraits éthanolique peuvent être constitués de composés polyphénoliques qui montrent généralement une puissance de réduction beaucoup plus élevée. Cela a été justifié par leur teneur en polyphénolique la plus élevée.

Afin de comparer l'activité réductrice de ces extraits de la plante par cette méthode, nous avons calculé les concentrations EC₅₀ qui est défini comme la concentration nécessaire pour réduire 50 % du fer. Le résultat obtenu illustrée dans le tableau.7 nous montre que l'extrait soxhelet possède une activité réductrice intéressante avec une concentration égale à 83,939±0,578µg/ mL. Ces valeurs sont supérieures par rapport à celles de l'acide ascorbique (99,176±0,764 µg/mL).

En ce qui concerne les effets des techniques d'extraction sur l'activité antioxydante, les pouvoirs réducteurs de tous les extraits de la plante médicinale ont été affectés par la technique d'extraction par le soxhelet suivi par la décoction, quel que soit le solvant utilisé. Si nous classons nos extraits selon la puissance de réduction de fer par rapport à l'acide ascorbique nous obtiendrons l'ordre suivant : EtOH(S) > acide ascorbique) > EtOH(D) > EtOH(M) > Aq(D)> Aq(M)

Tableau.8 : Activité antiradicale des extraits de l'*Helichrysum stoechas* et l'acide ascorbique

[c] (µg/mL)	Absorbance à 700 nm					
	Extrait éthanolique			Extrait aqueux		acide Ascorbique A
	EtOH(D)	EtOH(M)	EtOH(S)	Aq(M)	Aq(D)	
10	0,09±0,006	0,116±0,002	0,135±0,004	0,082±0,002	0,098±0,004	0,105±0,003
20	0,118±0,002	0,134±0,003	0,243±0,003	0,112±0,003	0,126±0,002	0,21±0,003
40	0,302±0,001	0,236±0,003	0,373±0,001	0,145±0,002	0,167±0,003	0,359±0,003
80	0,425±0,004	0,356±0,002	0,531±0,002	0,173±0,005	0,223±0,002	0,47±0,003
100	0,524±0,003	0,475±0,003	0,605±0,003	0,242±0,002	0,281±0,003	0,574±0,003
140	0,627±0,002	0,532±0,002	0,725±0,004	0,32±0,004	0,372±0,001	0,631±0,003
180	0,686±0,002	0,613±0,002	0,826±0,003	0,401±0,003	0,462±0,003	0,756±0,003
200	0,828±0,004	0,717±0,002	0,922±0,003	0,521±0,003	0,583±0,004	0,878±0,004

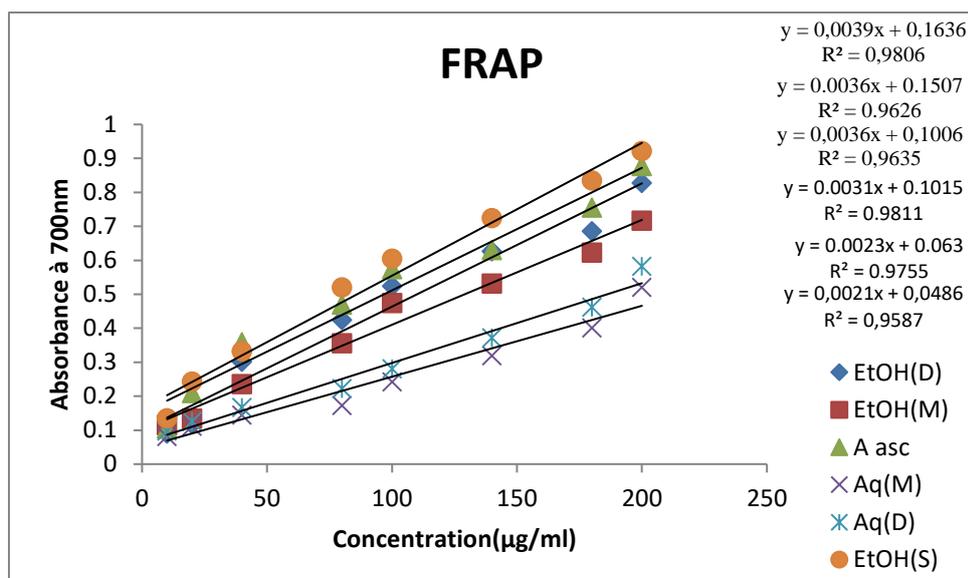


Figure.17 : Activité antiradicalaire testé par la méthode FRAP pour les extraits de *Helichrysum stoechas* et les standards.

III.4.3. Le piégeage du peroxyde d'hydrogène

La capacité des extraits à récupérer efficacement le peroxyde d'hydrogène, déterminé selon la méthode de Ruch *et al.*, (1989) (in Lalisa Wakjira Duresa, 2017), où ils sont comparés avec celui de l'acide ascorbique comme témoin. Les résultats obtenus pour le test du piégeage du peroxyde d'hydrogène par les différents extraits sont rapportés dans la figure. 16 et tableau.7. Les extraits étaient capables de piéger le peroxyde d'hydrogène d'une manière dépendant de la concentration (Annexe.2, Tab.2, Fig.5). La IC_{50} pour le piégeage de H_2O_2 était de $158,77 \pm 1,483$ pour l'extrait aqueux macéré, $126,03 \pm 0,54$ pour l'extrait aqueux décocté, $118,73 \pm 0,474$ pour l'extrait éthanolique macéré et $97,65 \pm 0,576$ µg/mL pour l'extrait éthanolique décocté, l'extrait éthanolique issu de soxhelet présente une IC_{50} de $72,75 \pm 0,407$, la valeur IC_{50} pour l'acide asorbique était de $32,90 \pm 0,681$ (µg/mL).

Le peroxyde d'hydrogène a la capacité de pénétrer les membranes biologiques et provoquer une cytotoxicité en donnant naissance à des radicaux hydroxyles dans la cellule. Ainsi, l'élimination de H_2O_2 est très importante (Gulcin, *et al.*, 2010). Bien que l'extrait éthanolique obtenu par soxhelet ait montré une bonne activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène par rapport aux autres extraits, il reste moins efficace que l'acide ascorbique standard.

Le piégeage de H_2O_2 par les extraits de plantes peut être attribué à leurs composés phénoliques, qui donnent leur électron à H_2O_2 , le réduisant ainsi en eau.

III.4.4. Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale de différents extraits de *H. stoechas* a été évaluée par la méthode au phosphomolybdène.

L'activité antioxydante totale de différents extraits a été estimée à partir de leur capacité à réduire le Phosphate-Mo (VI) en Phosphate Mo (V) et la formation ultérieure d'un complexe phosphate / Mo (V) de couleur bleu-vert à pH acide mesuré à 695 nm. La capacité antioxydante totale des échantillons d'essai a été calculée en utilisant la courbe standard de l'acide ascorbique ($y = 0,0031x + 0,0027$; $R^2 = 0,997$) (Annexe 2, Fig. 6). L'extrait éthanolique soxhelet a montré une capacité antioxydante totale plus élevée au BHT et inférieure à l'acide gallique (Tab.7 ; Fig.18).

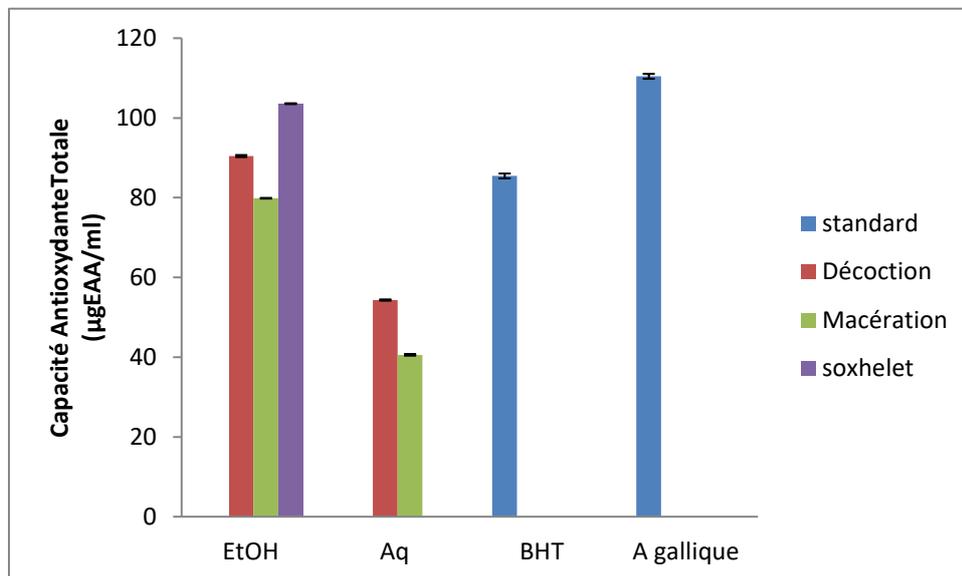


Figure.18 : La capacité antioxydante totale des extraits et les composés de références (acide gallique et BHT)

La figure 18 représente la capacité antioxydante totale obtenue par le dosage du phosphomolybdène pour chaque extrait par rapport à celle du BHT (antioxydant synthétique) et l'acide gallique tous deux utilisés comme références. Dans l'ensemble, l'extrait aqueux (Aq_M) ($40,594 \pm 0,208$ µg EAA / mg) présentait un potentiel antioxydant beaucoup plus faible que les autres extraits. Ce résultat est en accord avec l'effet antiradical le plus faible de l'extrait d'Aq déterminé par le test DPPH. En revanche l'extrait éthanolique soxhelet ($103,576 \pm 0,102$ µgEAA / mg) était le meilleur antioxydant, comme démontré par la valeur la plus élevée de CAT par rapport aux autres extraits, Il est suivi par l'extrait d'EtOH_(D)

(90,437±0,25 µg EAA / mg), qui n'est pas significativement différent de BHT. La capacité antioxydante de différents extraits pourrait bien être liée à la proportion de composés phénoliques qui le constituent (Saha *et al.*, 2017)

III.4.5. Corrélation entre les composés polyphénoliques, les flavonoïdes, tanins et les activités antioxydantes.

Les corrélations ont été analysées par le test de Pearson. Plusieurs études ont rapporté sur la relation entre les composés phytochimiques et activité antioxydante. Certains auteurs ont trouvés une forte corrélation entre contenu phénolique et l'activité antioxydante (Saeed *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2014; Bensaïdia *et al.*, 2018) d'autres n'ont rien trouvé (Ghasemi *et al.*, 2009 ; Ramful *et al.*, 2011). Dans cette étude, les résultats de corrélation positive ont été trouvés entre les valeurs de polyphénols et IC₅₀ de DPPH, faible corrélation pour peroxyde d'hydrogène, phosphomolybdate et Frap. Cependant les valeurs de tanins et les flavonoïdes présentes une meilleure corrélation pour tous les tests effectués (Tab.9), (Annexe. 2 ; Fig.7).

Tableau.9 : Corrélation entre polyphénols, flavonoïdes, tanins des extraits et leurs activités antioxydantes

Essais	Correlation R ²		
	Polyphénols	Flavonoïdes	Tannins
DPPH	0,6006	0,6444	0,7362
H2O2	0,4906	0,6224	0,8059
TCA	0,5198	0,7206	0,8364
FRAP	0,4258	0,6418	0,7581

L'activité antioxydante des différents extraits testés pourrait être attribuée à leur richesse en molécules à haut potentiel antiradical telles que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins. Cette hypothèse est confirmée par plusieurs auteurs qui attribuent l'activité antiradicalaire des extraits de plantes à ces molécules. (El Hajaji *et al.*, 2011).

III.5. Activité antimicrobienne

Les résultats de l'activité antibactérienne *in vitro* ont montré que les extraits possèdent un spectre d'activité large contre les micro-organismes testés comparée aux antibiotiques témoins (Tab. 10, Fig. 19).

Tableau.10 : Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne par les différents extraits de *H. stoechas* et les contrôles.

Bactéries testées	[C] (mg/mL)	Zone d'inhibition (moyenne ± SEM) (mm)					Contrôle Antibiotique	Témoins DMSO/H ₂ O
		Décoction		Macération		Soxhlet		
		EtOH (D)	Aq(D)	EtOH (M)	Aq(M)	EtOH (S)		
						NET10/C/Ny s 10/30µg/100/ Disque	6± 0.00 (-)	
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	50	6± 0.00 (-)	6± 0.00 (-)	6± 0.00 (-)	6± 0.00(-)	8,667 ±0,441	21 ± 0,000 (+++)	6± 0.00 (-)
	100	6± 0.00 (-)	6± 0.00 (-)	6± 0.00(-)	6± 0.00(-)	12,33±0,167 (+)	17,667±0,167 (++)	
	150	6± 0.00 (-)	6± 0.00 (-)	6± 0.00(-)	6± 0.00 (-)	14,33±0,167(+)		
<i>K. pneumonia</i> (ATCC4352)	50	10,667 ± 0,333 (+)	10,167 ±0,333 (+)	6± 0.00 (-)	6± 0.00(-)	11,667±0,167	27,16±0,167 (+++)	6± 0.00 (-)
	100	13,667 ± 0,441 (+)	11,833 ±0,167 (+)	12,333 ±0,833 (+)	6± 0.00(-)	14,5± 0,794	25,333±0,167 (+++)	
	150	16,167 ± 0,167 (++)	14,333± 0,333 (+)	14,667 ±0,333 (+)	13,000± 0,289(+)	18,5 ± 0, 577		
<i>S. aureus</i> (ATCC6538)	50	14,500 ± 0,500 (+)	6± 0.00 (-)	11,333 ±0,167 (+)	6± 0.00 (-)	15,667±0,726	18±0,000(++ 14 ± 0,000(+)	6± 0.00 (-)
	100	17,167 ± 0,333 (++)	6± 0.00(-)	13,667±0,441 (+)	6± 0.00(-)	20±0,866		
	150	20,333± 0,333 (+++)	6± 0.00(-)	17,667±0,441 (++)	6± 0.00(-)	25±0,764		
<i>B. cereus</i> (ATCC 10876)	50	6± 0.00 (-)	6± 0.00(-)	13,167 ±0,333 (+)	6± 0.00(-)	14,233±0,433	17,333±0,167 (++)	6± 0.00 (-)
	100	15,500 ± 0,764 (++)	6± 0.00(-)	15,500±0,289 (++)	6± 0.00(-)	19,5±0,924	17,333±0,167 (++)	
	150	18 ± 0,764 (++)	6± 0.00(-)	17 ±0,289 (++)	6±0.00(-)	22±0,964		
<i>E. faecalis</i> (ATCC2035)	50	13,000 ± 0,289 (+)	6± 0.00	13,500 ±0,289 (+)	6± 0.00(-)	15,33±0,441	21,333±0,167 (+++)	6± 0.00 (-)
	100	15,167 ± 0,333 (++)	6± 0.00	16,000±0,289 (++)	6± 0.00(-)	18,667±0,882	20 ± 000	
	150	18,333 ± 0,928 (++)	6± 0.00	17,000±0,577 (++)	6± 0.00(-)	22,5±0,601		
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	50	10± 0,289 (+)	6± 0.00(-)	6± 0.00(-)	6± 0.00(-)	12±0,289	22,5± 0,764 (+++)	6± 0.00 (-)
	100	13± 0,382 (+)	6± 0.00(-)	8,33± 0,167 (-)	6± 0.00(-)	17±0,5		
	150	17± 0,289 (++)	6± 0.00(-)	11± 0,577 (+)	6± 0.00(-)	21± 0,382		

Le diamètre des puits 6 mm est Inclus. Témoin: l'eau distillé et DMSO. NET : netilmicine, C : chloramphénicol. NY : nystatine. Les valeurs + et - représentent le degré de sensibilité des souches: Non sensible ou résistante (-): diamètre < 8 mm ; Sensible (+): 9 mm < diamètre < 14 mm; Très sensible (++) : 15mm < diamètre < 19 mm; Extrêmement sensible (+++): diamètre > 20 mm. Tous les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne ± SEM.

La zone d'inhibition augmente considérablement avec la concentration des extraits. Les bactéries à Gram⁺ sont les plus sensibles à l'effet de l'extraits éthanolique (soxhelet) avec des diamètres allant jusqu'à 25,333mm pour *S. aureus*, 21 ± 0.5 pour *E. faecalis* et $22 \pm 0,964$ mm pour *B. cereus*. La souche *E. coli* est résistante au différents extraits sauf l'extrait éthanolique obtenu par soxhelet par contre *K. pneumonia* est sensible au extraits de différents solvants et différente méthode. L'extrait aqueux issu de différente méthode est actif seulement sur *K. pneumonia* avec un diamètre allant de 13 à 14,333 mm. Il y' apparaît que chacun de cinq extraits possède une activité assez bien définie sur la croissance des bactéries testées. Concernant le *candida albicans*, les extraits éthanolique obtenus par les trois méthodes d'extraction sont actifs sur ce germe dont le diamètre allant de 11 à 21mm. Cependant, les diamètres d'inhibition induits par tous ces extraits se rapprochent à ceux de l'antibiotique de référence pour l'ensemble des souches. Nos résultats permettent de classer les bactéries selon leur sensibilité comme suit : *S. aureus* > *E. faecalis* > *B. cereus* > *K. pneumonia* > *E. coli*.

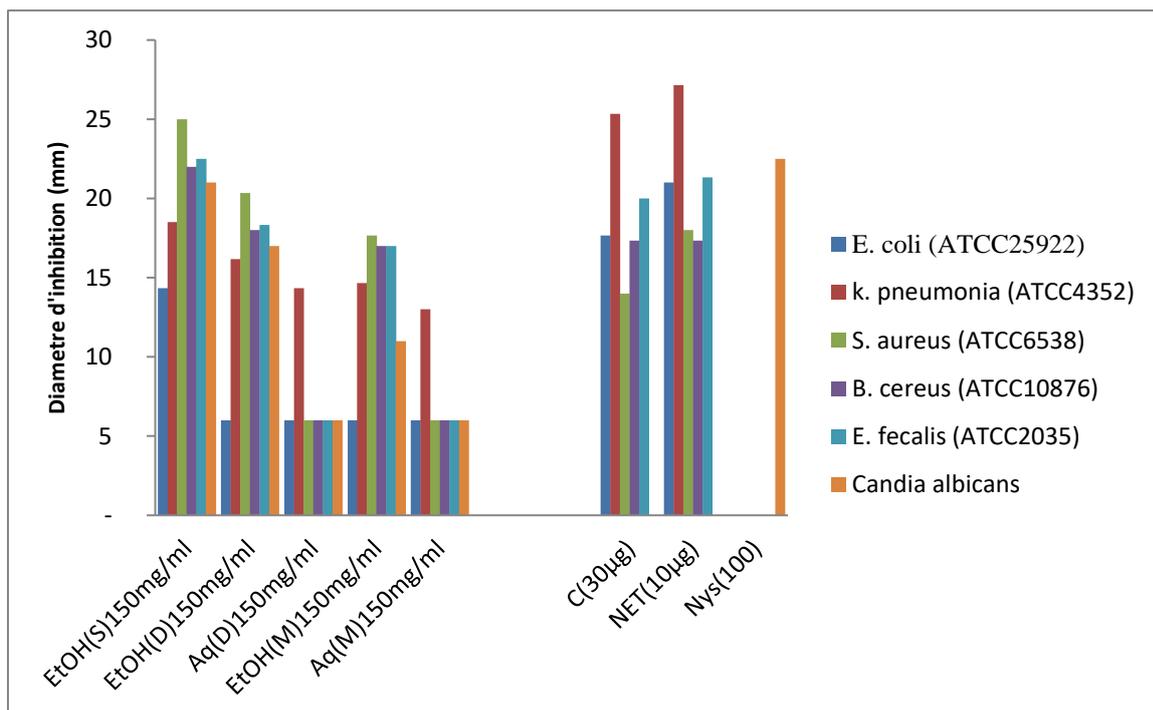


Figure.19 : Comparaison de l'activité antimicrobienne des standards, et les extraits hydro-alcooliques et aqueux à 150mg/mL de *H. stoechas* obtenus par macération, décoction et soxhelet. Tous les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne \pm SEM.

Les valeurs de CML concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition (Tab. 11, Fig. 20). Les extraits ayant induit une importante zone d'inhibition présentent les plus petites CMI sur les souches correspondantes. C'est le cas d'EtOH (S) sur *K.pneumonia* (ATCC4352), CMI est de 19,53 µg/mL et pour *S. aureus* (ATCC6538), CMI est de 39,062 µg/mL.

Tableau.11 : Activité microbicides des extraits de *H. stoechas*

Germes Testés	extraits	Concentration(µg/mL)			Décision
		CMI	CMB ou MFC	CMB/CMI	
<i>E.coli</i> (ATCC25922)	EtOH(S)	78,125	312,5	4	Bacteriostatique
	EtOH(D)	CMI Non déterminée			
	EtOH(M)				
	Aq(D)				
	Aq(M)				
<i>K.pneumonia</i> (ATCC4352)	EtOH(S)	19,53	156,25	8	Bacteriostatique
	EtOH(D)	78,12	156,25	2	Bactericide
	EtOH(M)	312,5	625	2	Bactericide
	Aq(D)	1250	1250	1	Bactericide
	Aq(M)	5000	>5000	>1	Bacteriostatique
<i>S.aureus</i> (ATCC6538)	EtOH(S)	39,062	39,062	1	Bactericide
	EtOH(D)	156,25	312,5	2	Bactericide
	EtOH(M)	625	2500	4	Bacteriostatique
	Aq(D)	CMI Non déterminée			
	Aq(M)				
<i>B.cereus</i> (ATCC10876)	EtOH(S)	312,5	625	2	Bactericide
	EtOH(D)	1250	1250	1	Bactericide
	EtOH(M)	1250	2500	2	Bactericide
	Aq(D)	CMI Non déterminée			
	Aq(M)				
<i>E.faecalis</i> (ATCC2035)	EtOH(S)	312,5	312,5	1	Bactericide
	EtOH(D)	625	1250	2	Bactericide
	EtOH(M)	1250	2500	1	Bactericide
	Aq(D)	CMI Non déterminée			
	Aq(M)				
<i>C.albicans</i> (ATCC10231)	EtOH(S)	156,5	312,5	2	Levuricide
	EtOH(D)	625	1250	2	Levuricide
	EtOH(M)	2500	2500	1	Levuricide
	Aq(D)	CMI Non déterminée			
	Aq(M)				

Il est déduit de cette expérience que l'extrait éthanolique a présenté des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 0,019 et 2,500 mg/mL sur la totalité de germes testés, alors que celles de l'extraits aqueux sont de 1,250 à 5 mg/mL seulement sur *K.pneumonia* (ATCC4352). Quant aux concentrations minimales bactéricides (CMB), elle variait de 0,156 à 2,5 mg/mL pour l'extrait éthanolique et de 1,250 à >5 mg/mL pour l'extrait aqueux.

Concernant le *Candida albicans*, l'extrait éthanolique a présenté des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 0,156.2 et 2,500 mg/mL (Fig.20).

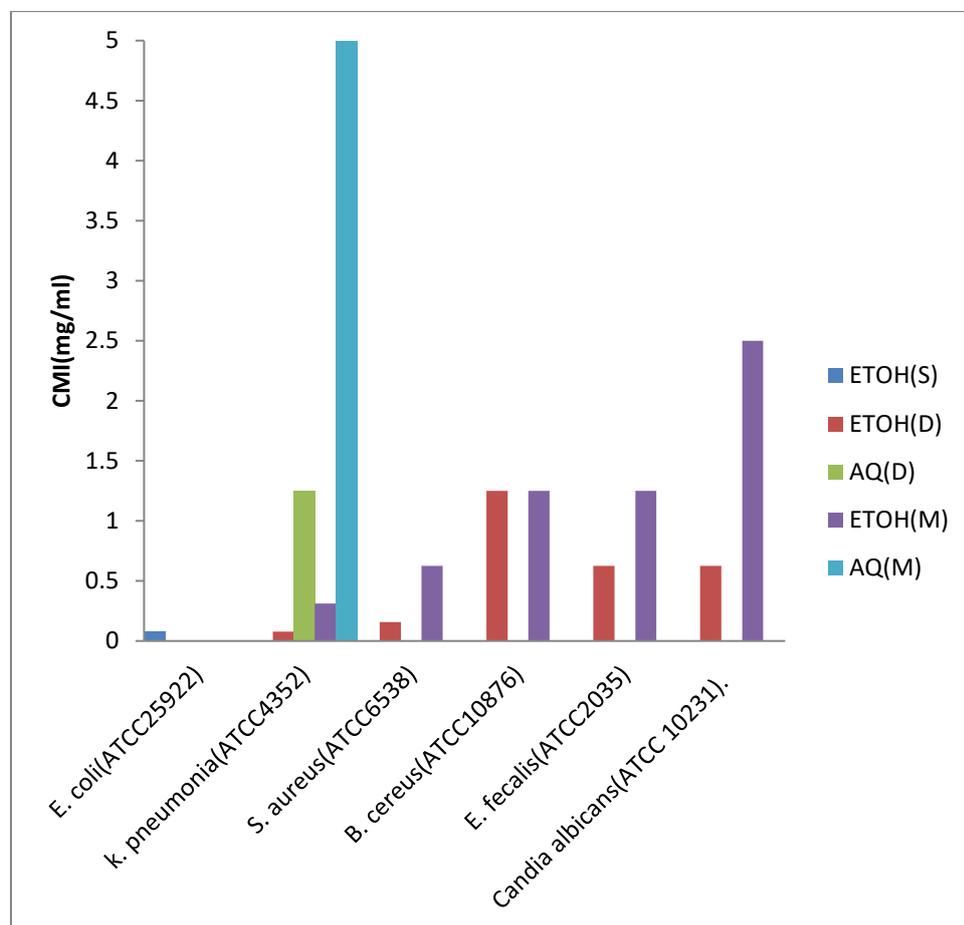


Figure.20 : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits d'*Helichrysum stoechas*

III.6. Discussion

Les espèces d'*Helichrysum* ont été étudiées par certains chercheurs sur le contenu phénolique et l'activité antioxydante. Leurs résultats montrent la richesse de ces espèces en polyphénols antioxydants.

Concernant l'espèce *Helichrysum stoechas* étudié, le résultat obtenu en polyphénols pour les extraits éthanoliques est très élevé (265,786 µg/mg) par rapport à celui trouvé par Les *et al.* (2017) (166.6 µg mg⁻¹) et par Barroso *et al.*, (2014) (135,61 mg/g) pour l'extrait méthanolique decocté de *Helichrysum stoechas*, par Albayrak *et al.*, (2010a) (94,16 mg/g) pour l'extrait méthanolique soxhlet de *H. stoechas* subsp. *barellieri*. Le choix du système de solvant d'extraction est très important dans la détermination des teneurs en polyphénols

totaux. En effet, la décoction éthanolique semble être convenable pour l'extraction des polyphénols totaux. Cela s'expliquerait par le fait que les rendements d'extraction en polyphénols sont plus élevés avec les solvants de polarité inférieure à celle de l'eau, et la même observation a été faite par Barroso *et al.*, (2014).

En ce qui concerne l'activité de piégeage des radicaux utilisant le test DPPH, les extraits éthanoliques ont montré une activité plus faible (25,13 µg/mL) que les extraits de méthanol d'*Helichrysum stoechas* subsp. *barellieri* de Turquie (la valeur d'IC₅₀ est de 7,95 µg/mL) (Albayrak *et al.*, 2010a) et plus forte que les extraits de méthanol d'*Helichrysum stoechas* prévenant de montagne de Babor à Sétif (46.30 µg/mL) (Krimat *et al.*, 2014) et de celle de Portugal (la valeur d'IC₅₀ est de 36,62 µg/mL (Barroso *et al.*, 2014).

Dans une étude concernant d'autres espèces de mêmes genres menée par Albayrak *et al.*, (2008) sur la réduction du DPPH par les extraits méthanoliques, il a été noté que l'extrait méthanolique de *Helichrysum sanguineum* donne une capacité maximale antiradicalaire (IC₅₀ = 12,90 µg/ mL) et que la capacité antiradicalaire minimale a été observée pour l'extrait d'*Helichrysum chasmolyticum* (IC₅₀ = 25,33 µg/ mL). Lourens *et al.*, (2004) ont également montré que des extraits acétoniques d'*Helichrysum dasyanthum* étaient les plus actifs piégeurs de radicaux libres (IC₅₀ = 9,53 µg/mL) par rapport aux autres *Helichrysum* étudiés.

Selon Tepe *et al.*, (2005), les sous-fractions non polaires des extraits au méthanol des espèces d'*Helichrysum* étudiées n'ont montré aucune activité antioxydante, alors que la plus active était *H. chionophilum* (IC₅₀ = 40,5 µg / mL).

Pour valider le pouvoir antioxydant d'*Helichrysum stoechas* d'autres tests ont été déterminés telle que la réduction de fer, de radical H₂O₂ et du molybdate Mo (VI). Ces test confirment que les extraits de plante possèdent des composés antioxydants capable de réduire les radicaux libres, les mêmes observations ont été obtenue par Haddouchi *et al.*, (2014) sur *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*.

Il a été rapporté que des plantes ayant des activités antioxydantes possèdent une activité de piégeage des radicaux libres. Les radicaux libres sont connus comme un contributeur majeur à plusieurs troubles cliniques tels que le diabète sucré, le cancer, les maladies du foie, l'insuffisance rénale et les maladies dégénératives dues à un mécanisme de défense antioxydant naturel déficiente (Pandey et Rizvi, 2009)

Le screening phytochimique des parties aériennes d'*Helichrysum stoechas* déterminé par les réactifs chimiques révèle la richesse de la plante en polyphénols, coumarines et saponines.

Par la CCM montre que la plante contient en particulier de la quercétine, de l'acide gallique et de la coumarine. Des résultats analogues ont été trouvés par Haddouchi *et al.*, (2012) sur des extraits méthanoliques *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* avec absence de coumarines et saponines.

L'analyse de l'extrait méthanolique macéré de fleurs d'*Helichrysum stoechas* Moench par Les *et al.*, (2017) a conduit à l'isolement et à l'identification de plusieurs composants de nature phénolique. Plus précisément arzanol, α -pyrone, hélipyrone, trois acides phénoliques, p-hydroxybenzoïque, les acides caféique et néochlorogénique, trois différents flavonoïdes, 5,7-dihydroxy-3,6,8-triméthoxyflavone, l'isoquercitrine (quercétine-3-O-glucoside) et la quercétagine-7-O-glucopyranoside et santinol B.

Silva *et al.* (2017) ont analysés par HPLC-MS des extraits aqueux décoctés (tiges / feuilles) et les parties florales d'*Helichrysum stoechas* et ont montré la présence d'acide chlorogénique, cynarine et isomères de cynarine (acide dicaféoylquinique) et l'arzanol. Ce dernier est également été identifié dans plusieurs autres extraits de genre d'*Helichrysum* telle que *Helichrysum Italicum*, *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* (Rosa *et al.*, 2007 ; Kothavade *et al.*, 2013). De plus, l'arzanol, est l'un des principaux composés identifié, a été démontré pour avoir un effet protecteur contre l'oxydation des lipides en limitant les effets toxiques (Rosa *et al.*, 2011).

Lavault et Richomme, (2004) ont séparé par chromatographie sur colonne et spectrophotomètre en masse et par CCM et identifié à partir de parties aériennes d'*Helichrysum stoechas* var. *olonense* 18 composés phénoliques [les α -pyrones, hélipyrone, les phloroglucinols, les acides phénoliques, les flavonoïdes (5-dihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone, quercetin, quercetin-3-O-b-D-glucoside), acide caféique et la coumarine] Carini *et al.* (2001) ont identifié dans des échantillons d'*Helichrysum stoechas* en provenance d'Italie cinq à sept acides phénoliques et flavonoïdes, parmi eux la flavone, l'apigénine et de la naringénine, l'acide dicaféoylquinique). La quercétine est détecté au niveau des capitules d'*Helichrysum stoechas*.

Albayrak *et al.* (2010a) ont déterminé à partir des extraits méthanoliques d'*Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri* par HPLC plusieurs composés phénoliques (acide chlorogénique, acide caféique, acide férulique, acide p-coumarique, apigénine, apigénine-7-glucoside, épicatechine, hespéridine la naringénine et la quercétine). Ces deux derniers composés se trouvent dans la majorité des extraits de plusieurs espèces d'*Helichrysum* étudiées par le même auteur. L'analyse chimique de l'extrait éthanolique obtenu à partir de l'*Helichrysum*

stoechas par Sobhy et El-Feky. (2007) ont révélé l'identification de dix constituants dans l'extrait, y compris la quercétine, la naringénine et l'apigénine.

La présence de phénols, de flavonoïdes et de tanins dans toutes les plantes est susceptible d'être responsable des effets de piégeage des radicaux libres observés. Les tanins sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Autres composés présent comme les saponines ont également des propriétés antifongiques. La présence de différents types de composés chimiques dans les extraits de plantes peuvent favoriser leur effet synergique et entraîne une plus grande activité antimicrobienne.

Concernant l'activité antimicrobienne des extraits d'*Helichrysum stoechas*, cette étude a révélé que l'extrait éthanolique soxhelet est très efficace sur les bactéries et la levure testées. Parmi elles, le *Staphylococcus aureus* et *E.coli* et *candida albicans* avec une CMI allant de 0.019-2.5mg/ml, alors que l'extrait aqueux n'a eu aucun effet sur la majorité des microorganismes étudiés.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Sobhy et El-Feky (2007) et Albayrak *et al.* (2010).

Aslan *et al.* (2007), Giovannini *et al.* (2008) et Krimat *et al.* (2014) ont constaté que les extraits hydro- alcooliques d'*Helichrysum stoechas* Moench subsp. *barrelieri* et *Helichrysum stoechas* normal et régénéré par transgénèse n'ont aucun effet sur *E.coli*.

L'extrait méthanolique (soxhelet) de *Helichrysum stoechas* collecté de la région nord et sud de Lybie a été étudié par Bogdadi *et al.* (2007) a montré un effet inhibiteur significatif sur tous les microorganismes testé (*E.coli*, *K.pneumonia*, *S.aureus*, *B.cereus* *C. albicans*) avec une CMI allant de 2-8 mg / mL. L'extrait méthanolique macéré de *Helichrysum stoechas* de El-Jabal El-Akhdar analysé par Faozia *et al.*, (2017) possède une activité antibactérienne modérée dont la CMI est comprises entre 3.125 et 25mg/mL, il contient les tanins et les saponines. Concernant la plante *Helichrysum stoechas* subsp.*rupestre*, Haddouchi *et al.*, (2016) ainsi que Chaouche *et al.* (2016) ont constaté que l'extrait le plus actif, avec les concentrations les plus faibles (0.78-1.56 mg/mL), est celui de l'hexane des tiges feuillées contre *Enterococcus faecalis* et *Acinetobacter baumannii* suivi par l'extrait de l'hexane de fleurs contre *Proteus mirabilis* et *Bacillus cereus* (1.56-3.12 mg/mL).

Pour d'autres germes tels que *Mycobacterium tuberculosis*, Buzayan et El-Garbulli, (2012) ont constaté que l'extrait aqueux d'*Helichrysum stoechas* n'a aucun effet sur le germe testé. Dans une étude contre *Mycobacterium tuberculosis* mené par Gouveia-Figueira *et al.* (2014) *Helichrysum devium* était très efficace contre *M. tuberculosis* avec une CMI égale à 50 µg ·

mL⁻¹ et *Helichrysum melaleucum* a donné une CMI de 100 µg mL⁻¹, tandis que *Helichrysum obconicum* présentait une CMI de 200 µg mL⁻¹

Quant aux propriétés antimicrobiennes des espèces différentes d'*Helichrysum*, Les CMI de l'extrait acétonique d'*Helichrysum cymosum* allant de 0,078 à 0,3 mg / mL contre les mêmes bactéries Gram-positif, Gram négatif et *Candida albicans* (ATCC 10231) testées ont été signalées par Van Vuuren *et al.*, (2006). L'extrait chloroformique d'*Helichrysum chasmolyticum* et le composé 3,5-dihydroxy-6,7,8- triméthoxyflavone isolé de cette plante par Süzgeç-Selçuk et Birteksöz (2011) sont actifs contre le *candida albicans* à la CMI de 312µg, même concentration trouvée dans cette étude pour les extraits éthanolique de d'*Helichrysum stoechas*.

Les extraits de quatre plantes étudiées par Albayrak *et al.* (2010b) (*Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum*, *Helichrysum arenarium* subsp. *rubicundum*, *Helichrysum armenium* subsp. *araxinum*, *Helichrysum plicatum* subsp. *pseudoplicatum*) sont actifs contre *Staphylococcus aureus* et inactifs contre *Escherichia coli*. Les mêmes résultats ont été déterminés sur les extraits de trois *Helichrysum* (*Helichrysum pamphylicum*, *Helichrysum sanguineum*, *Helichrysum chasmolyticum*) (Albayrak *et al.*, 2008). Les résultats obtenus par Lourens *et al.* (2004) à partir de l'extrait acétonique d'*Helichrysum dasyanthum*, avait la plus faible valeur de CMI (15,63 µg / mL) contre *Staphylococcus aureus*.

III.7. Activité antidiabétique *in vitro*

III.7.1. Effet de l'extrait aqueux d'*H stoechas* sur l'activité d' α -amylase

Le diabète sucré est un trouble métabolique chronique caractérisé par une hyperglycémie due à insuffisance insulinaire et / ou résistance à l'insuline contribuant à l'excès de glucose dans le sang. L'hyperglycémie a été un facteur de risque classique dans le développement du diabète et de ses complications, par conséquent, le contrôle des taux de glucose sanguin est essentiel dans le traitement précoce du diabète sucré.

Le manque d'insuline affecte le métabolisme des glucides, des protéines, de la graisse et cause une perturbation de l'homéostasie de l'eau et de l'électrolyte (Narkhede *et al.*, 2011).

Les progrès récents concernant la compréhension des activités des enzymes intestinales (l' α -amylase et l' α -glucosidase), la digestion et l'absorption du glucose ont conduit au développement de nouveaux traitements pharmacologiques.

L'une des approches thérapeutiques importantes est la prévention de l'absorption des glucides après l'ingestion d'aliments, qui est facilitée par l'inhibition des enzymes entérique comprenant l' α -glucosidase et l' α -amylase présentent dans la bordure en brosse intestinale.

L'inhibition de ces enzymes retiennent la digestion des hydrates de carbone et prolongent le temps total de digestion des hydrates de carbone, conduisant à une diminution du taux d'absorption du glucose et donc de réduire le niveau de glucose dans le sang.

L'inhibition de ces enzymes a été une option forte dans la prévention du diabète. Ainsi, des inhibiteurs synthétiques comme acarbose, voglibose, miglitol et la metformine sont largement utilisés chez les diabétiques de type 2 de nos jours, mais ils ont beaucoup d'effets secondaires graves comme l'hépatotoxicité, les douleurs abdominales, maladies cardiovasculaires, maladies cérébro-vasculaires et hypoglycémie (Bhat *et al.*, 2011).

De nombreux extraits de plantes médicinales ont été identifiés pour inhiber ces activités enzymatiques avec moins d'effets secondaires et des recherches sont toujours en cours (Akkarachiyasit *et al.*, 2011). Pour ce but, nous avons étudié l'effet de l'extrait aqueux de *H. stoechas* sur l' α amylase salivaire, l'absorption de glucose et sur la glycosylation non enzymatique de l'hémoglobine.

L' α amylase se trouve dans la salive, le pancréas et dans l'intestin grêle. L' α -amylase pancréatiques hydrolyse les liaisons α 1-4 de l'amidon partiellement digéré en oligosaccharides qui est ensuite excrétée dans la lumière de l'intestin grêle et hydrolysée en glucose, puis porté par le sang, ainsi en inhibant l' α -amylase, le niveau de glucose post prandial dans le sang se réduit (Carreon *et al.*, 2013).

L'extrait aqueux Aq(D) de *H. stoechas* a révélé une action inhibitrice significative sur l' α -amylase. La concentration de 100 μ g/mL d'extrait aqueux obtenu par décoction a montré un pourcentage d'inhibition de 43,92% et pour 1000 μ g/mL l'inhibition est de 83,5%.

L'augmentation du pourcentage d'activité inhibitrice vis-à-vis de l'enzyme α -amylase est dépendant de la dose. L'activité inhibitrice de l' α -amylase n'est pas significative pour l'extrait Aq(M) en comparaison à la metformine, médicament standard, utilisé avec une dose similaire (Tab. 12, Fig. 21).

Tableau.12 : Inhibition de l'activité α -amylase par les extraits aqueux de *H. stoechas* et la metformine

Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Metformine		Aq(D)		Aq(M)	
	Abs à565nm	%inh	Abs à565nm	%inh	Abs à565nm	%inh
50	0,107 \pm 0,002	22,43	0,128 \pm 0,006	35,16	0,093 \pm 0,009	10,75
100	0,121 \pm 0,002	31,4	0,148 \pm 0,003	43,92	0,101 \pm 0,01	17,82
250	0,161 \pm 0,004	48,45	0,175 \pm 0,003	52,57	0,110 \pm 0,009	24,55
500	0,205 \pm 0,002	59,51	0,241 \pm 0,004	65,56	0,126 \pm 0,009	34,13
750	0,232 \pm 0,002	64,22	0,380 \pm 0,004	78,16	0,135 \pm 0,008	38,52
1000	0,365 \pm 0,003	77,26	0,503 \pm 0,009	83,5	0,146 \pm 0,005	43,15
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	431,68		244,42		1121,36	

Standard : la Metformine (témoin positif), médicament utilisé en thérapeutique comme inhibiteur de l'alpha-glucosidase et de l'alpha-amylase. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM Absorbance de blanc = 0.083 \pm 0.003.

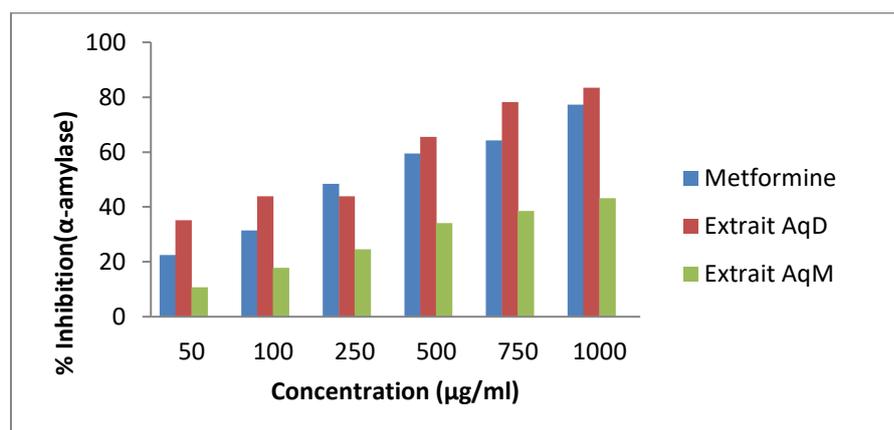


Figure.21 : Pourcentage d'inhibition (%) de l' α -amylase par les extraits aqueux de *H. stoechas* et le standard, metformine

Les inhibiteurs de l' α -amylase agissent comme un anti-nutriment qui entrave la digestion et l'absorption des hydrates de carbone. Ils se lient à l' α -liaison du polysaccharide et empêchent la rupture du polysaccharide en mono et disaccharide. Il a été proposé que la suppression de l'activité de ces enzymes digestives retarde la dégradation de l'amidon et oligosaccharides, ce qui entraînerait à son tour une diminution de l'absorption du glucose et par conséquent, la réduction de l'élévation du taux de glycémie postprandiale (Narkhede *et al.*, 2011 ; Abirami *et al.*, 2014). Cette étude révèle que les parties aériennes de *Helichrysum stoechas* inhibent efficacement l'enzyme α -amylase in vitro. De plus, il est remarquable de

constaté que dans une étude réalisée par Les *et al.* (2017) sur *H. stoechas* que l'extrait méthanolique des fleurs (HSME) a montré une activité inhibitrice pour des enzymes telles que l' α -Glucosidase (α -GLU) et la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4), toutes deux impliquées dans métabolisme de glucose et la glycémie.

Dans une autre étude concernant d'autres espèces de *Helichysum*, les résultats montrent un effet inhibiteur dépendant de la dose sur l'enzyme α -amylase et que l'extrait hydro-alcoolique de *Helichysum graveolens* présente une inhibition enzymatique *in vitro* à un degré semblable à l'Acarbose à 3000 μ g/mL et l'extrait aqueux de *Helichysum plicatum* n'a aucun effet (Orhan *et al.*, 2014).

Les mécanismes réactionnels impliqués dans l'inhibition des enzymes α -amylases par les inhibiteurs d'origine végétales ne sont pas clairement compris. Mais il y a quelques suggestions que les flavonoïdes (flavanols, luteoline et les anthocyanines) pourrait causer des changements conformationnels dans la structure de l'enzyme ou se lie à un site autre que le site actif de l'enzyme, se combine à l'enzyme libre ou au complexe substrat enzymatique et pouvant interférer avec l'action de tous les deux donnant un complexe enzyme-substrat-inhibiteur inactif (Kim *et al.*, 2000 ; Akkarachiyasit *et al.*, 2011). Les différentes classes de composés phénoliques modulant la répartition enzymatique des hydrates de carbone en inhibant amylases et glucosidase sont décrites dans la littérature (Vinayagam et Xu, 2015). L' α -glucosidase et amylases ont été efficacement inhibées par Naringénine, kaempferol, lutéoline, apigénine, catéchine, épicatechine, diadzéine et gallate d'épigallocatechine (Tadera *et al.*, 2006). Les effets inhibiteurs de l'extrait aqueux de *Helichysum stoechas* sur l' α -amylase peuvent être attribués respectivement à la présence de composés phytochimiques, flavonoïdes, tanins, anthocyanine et saponines. Des études antérieures ont confirmés la présence dans les extraits de plantes de *Helichysum stoechas* de l'acide chlorogénique, naringénine, quercétine, l'apigénine, acide caféique, acide ferulique, acide p-coumarique, apigénine-7-glucoside, épicatechine, hespéridine (Carini *et al.*, 2001 ; Lavault et Richomme, 2004). L'effet inhibiteur de l'acide cinnamique et chlorogénique et leurs dérivés sur l' α amylase et glucosidase est confirmé chez l'homme et le rat (Hengameh et Rajkumar, 2016 ; Adisakwattana, 2017).

L'inhibition de l'activité des enzymes par les plantes médicinales pourrait être attribuée à plusieurs facteurs possibles tels que la concentration des fibres, la présence d'inhibiteurs sur les fibres, l'encapsulation de l'amidon et de l'enzyme par les fibres présentes dans l'échantillon, réduisant ainsi l'accessibilité de l'amidon à l'enzyme et l'absorption directe de

l'enzyme sur les fibres, conduisant à une diminution de l'activité enzymatique (Sairam et Urooj, 2013).

Outre la présence de fibres, des études suggèrent le potentiel des phytochimiques dans la lutte contre les troubles diabétiques, pour lesquels plusieurs ont été proposés, tels que l'inhibition des enzymes métabolisant les glucides, la manipulation des transporteurs de glucose, la régénération des cellules β et l'amélioration de l'activité de libération de l'insuline (Tiwari et Rao, 2002). Cliniquement les inhibiteurs de l' α -glucosidase, dont une grande partie repose sur l'Acarbose, le Miglitol et Voglibose, montre qu'ils ralentissent la vitesse de distribution des glucides, provoque une accumulation d'un nombre excessif de courtes chaînes carbohydrate ce qui peut provoquer des troubles hépatiques et d'autres symptômes gastro-intestinaux négatifs (Sugihara *et al.*, 2014). Par conséquent, des inhibiteurs de l' α -glucosidase provenant de sources naturelles, en particulier les plantes médicinales, sont souhaitables du point de vue de l'application clinique pour le traitement de l'hyperglycémie postprandiale (Gul-E *et al.*, 2013).

III.7.2. Effet des extraits aqueux de *H. stoechas* sur l'absorption du glucose par les cellules de levure.

Le mécanisme de transport du glucose à travers la membrane cellulaire de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) a reçu une attention comme méthode de dépistage *in vitro* pour l'hyperglycémie. Le taux de transport du glucose à travers la membrane cellulaire a été étudiée dans un système *in vitro* comprenant des cellules de levure suspendues dans une solution de glucose de concentration variable (5, 10, 20 mM) avec la présence des extraits à différentes concentrations. La quantité de glucose restant dans le milieu après un temps de contact avec les cellules de levures sert d'indicateur de l'absorption du glucose par les cellules. L'extrait aqueux par décoction a augmenté et amélioré l'absorption de glucose par les cellules de levure par rapport à l'extrait aqueux de macération. On a calculé l'augmentation en pourcentage de l'absorption de glucose par les cellules de levure en présence de concentration de l'extrait aqueux décoction allant de 50 à 1000 μ g et on a trouvé qu'elle variait entre 27,36% à 81,68% dans la concentration de glucose 5 mM et 36, 57% à 87,89 dans 10 mM de glucose et 15,44% et 65,33% dans 20 mM de glucose (Tab. 13, Tab. 14 et Tab.15).

Tableau.13 : Effet de l'extrait aqueux de *H. stoechas* et le standard (Metformine) sur l'absorption de glucose (5mM) par les cellules de levure.

Glucose 5Mm			
Conc (µg/mL)	% augmentation de l'absorption de glucose		
	Standard Metformine	Extrait Aq(D)	Extrait Aq(M)
50	23,26±1,84	27,36±1,49	16,16±2,32
100	29,56±3,56	34,33±1,92	21,41±2,01
250	40,78±1,41	46,25±2,43	26,36±2,05
500	56,80±2,63	64,23±1,03	31,41±2,55
750	69,48±0,79	76,47±0,61	37,72±1,68
1000	78,67±0,72	81,68±0,55	42,4±1,38
IC₅₀(µg/mL)	445,52	354,84	1249,57

Tableau.14 : Effet de l'extrait aqueux de *H. stoechas* et le standard (Metformine) sur l'absorption de glucose (10mM) par les cellules de levure

Glucose 10mM			
Conc (µg/mL)	% augmentation de l'absorption de glucose		
	Standard Metformine	Extrait Aq(D)	Extrait Aq(M)
50	28,20±0,55	36,57±1,51	20,32±3,06
100	32,74±1,02	45,78±0,58	26,36±1,52
250	51,37±0,44	58,17±1,80	29,64±3,21
500	62,12±0,68	67,21±1,47	36,55±0,66
750	75,25±0,43	79,21±0,43	41,58±1,35
1000	82,88±0,42	87,89±0,28	49,75±0,91
IC₅₀(µg/mL)	346,85	195,4	1012,04

Tableau.15 : Effet de l'extrait aqueux de *H. stoechas* et le standard (Metformine) sur l'absorption de glucose (20mM) par les cellules de levure

Glucose 20Mm			
Conc (µg/mL)	% augmentation de l'absorption de glucose		
	Standard Metformine	Extrait Aq(D)	Extrait Aq(M)
50	12,06±1,10	15,44±0,83	11,09±0,52
100	23,97±1,87	26,02±0,75	19,24±2,67
250	31,02±1,23	34,96±1,19	23,32±2,78
500	40,80±0,81	44,61±0,88	27,12±2,43
750	52,23±1,45	57,25±0,85	32,47±1,32
1000	63,31±1,03	65,33±0,65	37,36±1,21
IC₅₀(µg/mL)	703,05	634,19	1487,86

Dans cette étude, le taux d'absorption de glucose augmente de manière proportionnelle avec la concentration de la fraction végétale et diminue avec la concentration de glucose extracellulaire croissante (Fig.22, Fig.23, Fig.24). Ce résultat est semblable à ceux obtenus par l'extrait méthanolique de *Mussaenda tomentosa* (Muruganandam *et al.*, 2016) et l'extrait aqueux de *Artocarpus altilis* (Sairam et Urooj, 2012). Le taux d'absorption pour l'extrait aqueux par décoction était supérieur à celui de l'extrait par macération. Cependant, dans une autre étude concernant l'*Artocarpus altilis*, le résultat obtenu par macération est le meilleur par rapport à la décoction et la poudre testée (Sairam et Urooj, 2013).

Les résultats ont également indiqué que l'extrait aqueux de *H.stoechas* avait une plus grande efficacité on augmentant l'absorption de glucose par les cellules de levure par rapport au metformine (médicament standard). Le transport de glucose à travers la membrane cellulaire de levure se produit par diffusion facilitée, un mécanisme passif sans apport d'énergie, caractérisé par leur faible affinité pour le glucose (10 à 20mM) (Maier *et al.*, 2002). Le transport du glucose est continué si le glucose intracellulaire est efficacement réduit ou utilisé (Abirami *et al.*, 2014 ; Ogundele *et al.*, 2017). L'augmentation de l'absorption de glucose est un reflet pour la capacité de l'extrait à améliorer l'utilisation du glucose par levure.

Les résultats obtenues suggèrent clairement que l'extrait aqueux de *H.stoechas* est capable de modifier efficacement l'absorption du glucose ce qui suggère à son tour qu'il est capable d'améliorer l'utilisation du glucose, ce qu'il lui permet de contrôler la glycémie.

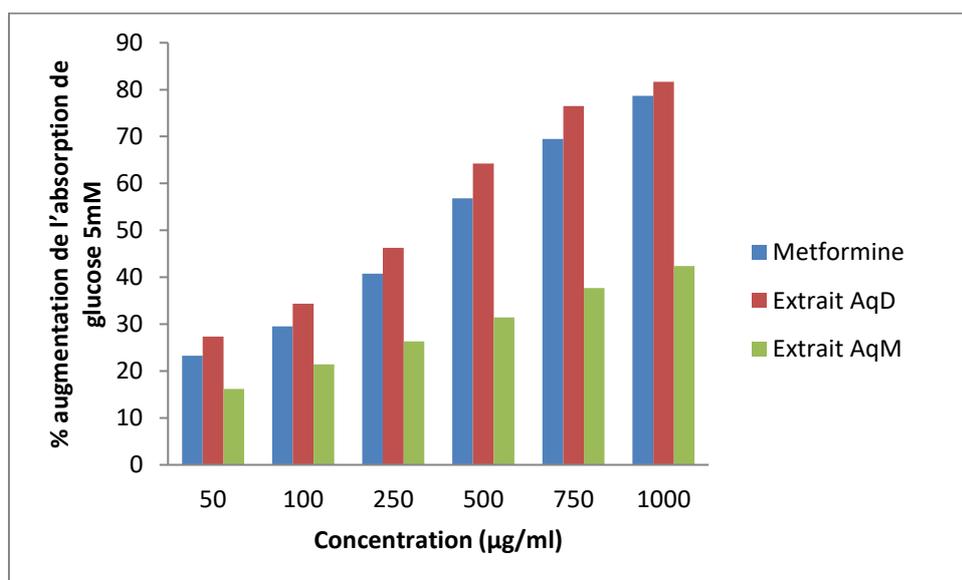


Figure.22 : Absorption du glucose à 5 mM en fonction de la concentration de l'extrait de *H. stoechas*

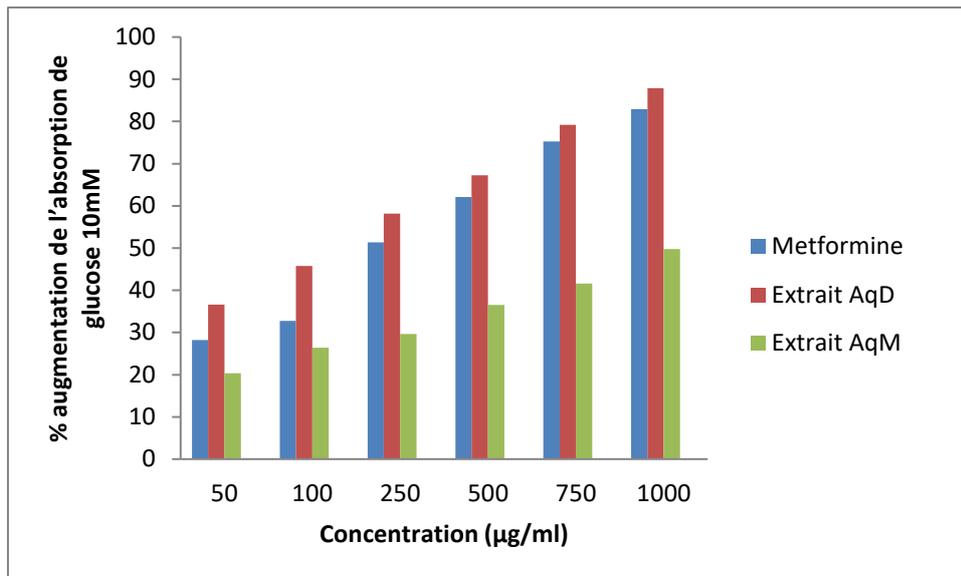


Figure.23 : Absorption du glucose à 10 mM en fonction de la concentration de l'extrait de *H. stoechas*.

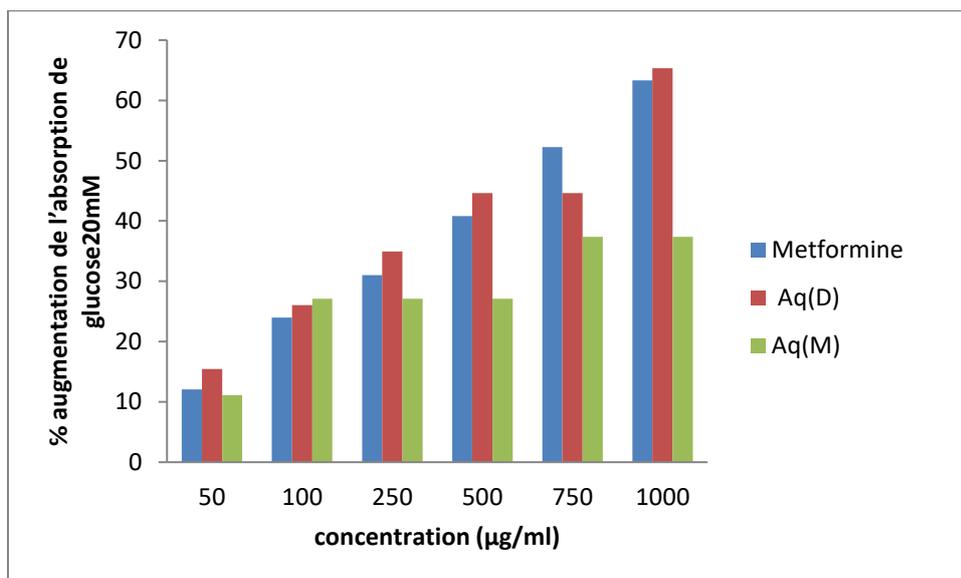


Figure.24 : Absorption du glucose à 20 mM en fonction de la concentration de l'extrait de *H. stoechas*.

III.7.3. La glycosylation non enzymatique de l'hémoglobine

III.7.3.1. Détermination des conditions pour la glycosylation de l'hémoglobine.

L'hémoglobine présente dans les globules rouges a tendance à se lier au glucose. Plus la concentration de glucose dans le sang est grande, plus la quantité d'hémoglobine liée au

glucose est importante. Récemment, un comité d'experts internationaux a proposé une révision des critères diagnostiques pour le diabète, recommandant que l'hémoglycosylation (HbA1C) puisse être un meilleur moyen de diagnostiquer le diabète que les mesures de glucose et, par conséquent, il devrait être adopté comme critère de diagnostic pour le diabète (Gillett, 2009). La glycation de l'hémoglobine a été impliquée dans la néphropathie et la rétinopathie associées au diabète sucré. La surveillance de l'HbA1C chez les patients diabétiques peut améliorer le traitement.

Dans la durée de la vie normale des globules rouges (120 jours), les molécules de glucoses se joignent à l'hémoglobine, formant de l'hémoglobine glyquée. Chez les personnes atteintes d'un diabète mal contrôlé, des quantités de l'hémoglobine glyquée sont notées (Ashok *et al.*, 2011).

Notre étude a révélé que la glycosylation de l'hémoglobine augmente avec la concentration croissante de glucose (2, 10 et 20mg) sur une période de 72 heures (Tab. 16). Les résultats obtenus confirment que 72h d'incubation est le temps le plus utile pour la glycosylation et que la meilleure concentration en glucose est 20 mg, la même confirmation a été signalée par (Pal *et al.*, 2010).

Tableau.16 : Effet de la concentration du glucose et de la durée d'exposition sur la glycosylation de l'hémoglobine

Concentration		Absorbance à 520nm		
Glucose (mg/mL)	24h	48h	72h	
2	0,0 20±0,003	0, 035±0,22	0.0 51±0,15	
10	0,0 24±0,004	0. 059±0,25	0, 068±0,13	
20	0, 053±0,15	0,0 72±0,28	0. 194±0,11	

III.7.3.2. L'effet des extraits aqueux sur la glycosylation d'hémoglobine

Lorsque la concentration de la Metformine augmente, la formation du complexe glucose-hémoglobine diminue et l'hémoglobine libre augmente, ce qui montre l'inhibition de l'hémoglobine glycosylée. Les résultats de la présente étude, pour la glycosylation non enzymatique de l'hémoglobine (l'hémoglycosylation), ont montré que les extraits aqueux de la plante ont une action inhibitrice meilleure que le médicament standard (Metformine). Le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration de l'échantillon, il est dose-dépendant. Il est de 33,04% à 79,67% pour la concentration de 50µg – 1000µg de

l'extrait Aq(D). Ce qui indique que les extraits de plantes diminuent la formation du complexe hémoglobine - glucose, et par conséquent l'absorbance augmente (Tab. 17; Fig. 25).

Tableau.17 : Effet des extraits aqueux et du standard (Metformine) sur la glycosylation non enzymatique de l'hémoglobine

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Glycosylation de l'hémoglobine (% d'inhibition)		
	Standard Metformine	Extrait Aq(D)	Extrait Aq(M)
50	26,31 \pm 0,47	33,04 \pm 0,35	10,03 \pm 1,67
100	35,51 \pm 0,29	39,33 \pm 0,26	18,61 \pm 0,72
250	49,15 \pm 0,34	54,06 \pm 0,10	22,55 \pm 0,40
500	57,18 \pm 0,23	69,41 \pm 0,32	28,67 \pm 0,05
750	63,17 \pm 0,11	73,88 \pm 0,17	35,78 \pm 0,22
1000	72,83 \pm 0,20	79,67 \pm 0,22	43,32 \pm 0,13
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	425,92	270,98	1197,14

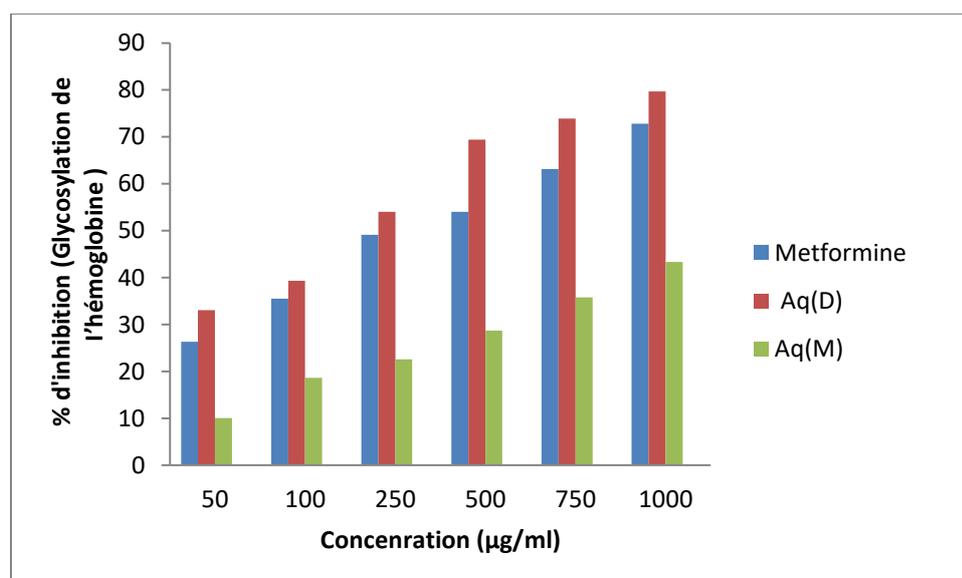


Figure.25 : Effet des extraits de *H. stoechas* sur l'inhibition de la glycosylation de l'hémoglobine

La glycosylation de l'hémoglobine s'effectue sous conditions physiologiques par une réaction entre le glucose et le N- terminal de la chaîne bêta des molécules d'hémoglobine (Kareem *et al.*, 2004).

Les radicaux libres et les oxydants sont également impliqués dans la glycation et le processus peut donc être appelé glycoxydation, il semble que l'activité antiglycation des extraits sont dues à leurs propriétés antioxydantes (Pal *et al.*, 2010).

Chez les diabétiques, le stress oxydatif dû à une augmentation de la production de radicaux libres conduit au développement de complications diabétiques. L'hyperglycémie chronique au cours du diabète provoque la glycation des protéines qui à son tour conduit à des complications secondaires affectant les yeux, les reins, les nerfs et les artères. Les extraits végétaux peuvent jouer un rôle important dans l'inhibition des produits finaux de glycosylation (Asgary *et al.*, 2006).

III.8. Activité anti-hyperglycémiant *in vivo* de l'extrait aqueux décocté

Au cours des dernières années, beaucoup d'attention a été portée sur l'utilisation de produits naturels comme thérapie alternative pour le traitement de nombreuses maladies, y compris le diabète sucré.

En Algérie, les plantes médicinales n'ont jamais été totalement abandonnées et les gens n'ont jamais cessé de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir une tradition thérapeutique vivante malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne.

La décoction ou l'infusion sont souvent les méthodes de préparation des plantes médicinales les plus utilisées et les plus citées dans la littérature. Dans de très rares cas, d'autres méthodes de préparation et d'utilisation ont été enregistrées comme des applications directes du matériel végétal en poudre ou sous la forme d'inhalation de vapeurs (Aburjai *et al.*, 2007).

L'effet antidiabétique *in vivo* d'*Helichrysum stoechas* a été étudié pour la première fois.

III.8.1. Effet à court terme (aigüe)

III.8.1.1. Effet de l'extrait aqueux décocté chez les souris normo-glycémiques

L'effet de l'extrait aqueux (Ext aq HS) de *H. staechas* à différentes doses (250, 500 et 1000 mg/kg p.c.) administrées par voie orale, sur la glycémie à jeun des souris normales, est étudié. L'analyse de différents histogrammes représentant la variation de glucose sanguin en fonction du temps, montre qu'il y'a une diminution significative de la glycémie chez les souris traitées par l'extrait. L'administration de l'eau physiologique ne modifie pas la glycémie basale des souris au bout de six heures d'observation alors que la dose de 1000 mg/kg d'Ext aq HS induit une diminution significative de la glycémie qui passe de $86,67 \pm 1,45$ mg/dl au temps 0 à $71,67 \pm 1,20$ mg/dl, après deux heures d'observation. Cette valeur continue à diminuer jusqu'à ce qu'elle atteigne $54,67 \pm 2,03$ mg/dl après six heures.

Pour la même dose 1000mg d'extrait de plante mélangé avec la metformine (250 mg/kg), le taux de sucre a atteint $50,67 \pm 1,76$ mg/dl après 6 heures, ce qui laisse déduire qu'il y a une synergie entre l'extrait de plantes et le médicament et que l'activité de l'extrait aqueux était plus efficace que le médicament de référence. La metformine (250 mg/kg) a réduit le taux de glucose sanguin à $59,67 \pm 0,88$ mg/dl après 6 heures (Tab.18, Fig. 26).

Tableau.18 : Evolution de la valeur moyenne de la glycémie des souris en fonction du traitement à court terme aux différents extraits aqueux, standard et leur combinaison

Traitement	Taux de glucose (mg/dl)				
	0 min	60min	120min	240min	360min
Eau saline (10 mL/kg)	$86 \pm 1,73$	$95,33 \pm 1,76$	$89,67 \pm 1,45$	$87 \pm 1,15$	$85,33 \pm 1,52$
Metformine (250 mg/kg)	$83,33 \pm 1,45$	$94,67 \pm 2,40$	$90 \pm 1,73$	$73 \pm 2,30$	$59,67 \pm 0,88$
Ext aq HS(250 mg/kg)	$84,67 \pm 0,88$	$110 \pm 1,15$	$85 \pm 2,30$	$69 \pm 1,53$	$65,67 \pm 1,76$
Ext aq HS(500 mg/kg)	$89,67 \pm 1,45$	$108 \pm 1,15$	$76,67 \pm 1,76$	$63,67 \pm 2,33$	$58,67 \pm 2,85$
Ext aq HS(1000 mg/kg)	$86,67 \pm 1,45$	$104,33 \pm 0,88$	$71,67 \pm 1,20$	$60,33 \pm 0,88$	$54,67 \pm 2,03$
Metformine (250 mg/kg) + Ext aq HS(1000mg/kg)	$85,67 \pm 1,45$	$92,33 \pm 1,20$	$78 \pm 1,73$	$55,33 \pm 0,88$	$50,67 \pm 1,76$

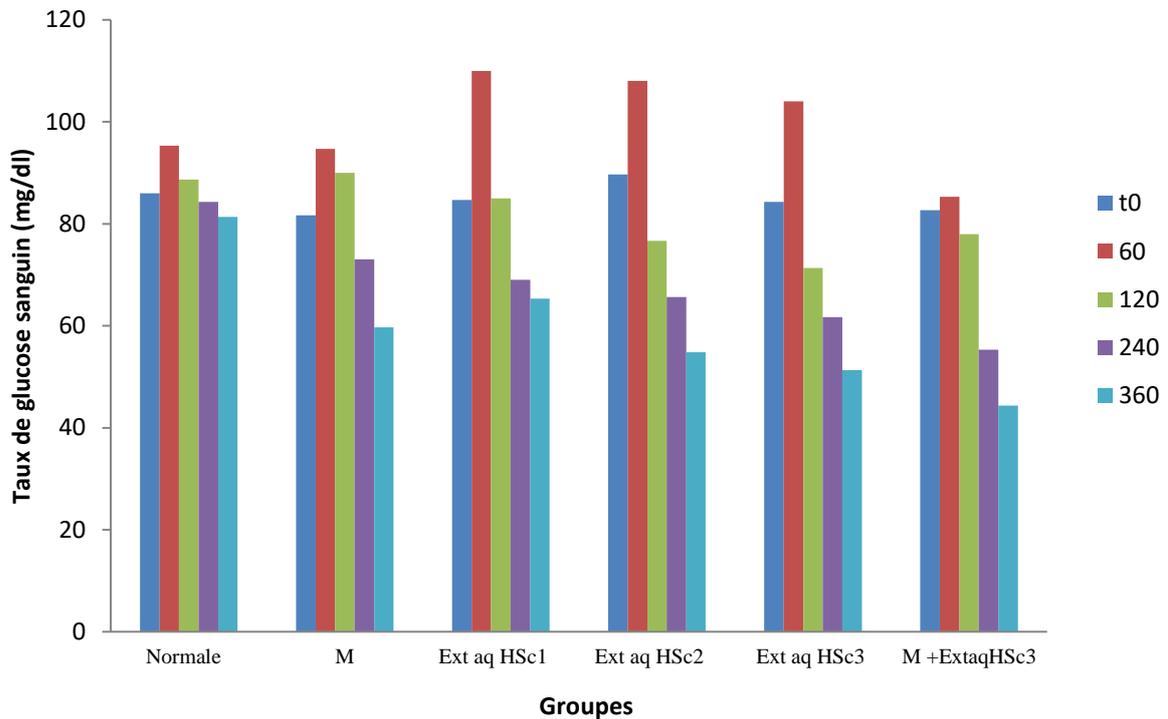


Figure.26 : Evolution de la glycémie chez les souris normales soumis au traitement à courte terme aux différents extraits aqueux de *H. stoechas* durant 4 heures.

HS : *Helichrysum stoechas*, c1=250mg/kg, c2=500mg/kg, c3=1000mg/kg, M+ExeaqHSc3 combinaison entre 1000 mg de HS et 100mg de metformine

III.8.1. 2. Effet à courte terme (aigüe) sur le taux sanguin suite à un test de tolérance orale de glucose

L'effet de l'Ext aq HS aux doses de 250, 500 et 1000 mg/kg, sur la glycémie des souris normales soumises à un test de tolérance orale au glucose (TTOG) 30 min après un traitement donné, a permis de diminuer le taux de glucose après six heures mieux que la metformine (Tab. 19 ; Fig. 27).

Dans nos conditions expérimentales et aux doses testées, l'extrait aqueux décocté de *H.stoechas* a présenté une activité antiglycémiant chez les souris après une hyperglycémie temporaire à une heure. Une augmentation statistiquement significative de la glycémie ($p < 0.01$), 60 min après le gavage du glucose a été notée pour toutes les souris traitées, puis une diminution progressive qui tente d'atteindre son taux initial à 320 min. À noter aussi que l'extrait aqueux à la dose de 1000 mg/kg p.c a provoqué une hyperglycémie de $104,67 \pm 1,86$, 60 min après son gavage et une hypoglycémie de $54,33 \pm 1,76$ à 360 min statistiquement significative

($p < 0.01$). Nous constatons aussi une diminution de l'hyperglycémie temporaire chez les lots de souris traitées avec la metformine à la dose 250mg/kg. Selon l'analyse statistique, la diminution est très significative concernant le mélange de l'extrait avec metformine ($p < 0.001$)

Tableau.19 : Effet de l'extrait aqueux décocté (Ext aq HS), standard et leur combinaison sur le taux de glucose sanguin des souris normo-glycémique soumises à un test de tolérance orale au glucose (TTOG).

Traitement	Le taux de glucose sanguin (mg/dl)					
	0	30min	60min	120min	240min	360min
Eau saline (10 mL/kg)	86 ±1,73	90,67±1,20	95,33±1,76	89,67±1,45	87±1,15	85,33±1,52
Contrôle Eau saline (10 mL/kg) + Glucose (3 g/kg)	94,67±1,45	102,33±1,76	122,33±2,03	110±1,15	95,33±1,45	92±1,53
Metformin (250 mg/kg + Glucose (3 g/kg)	95,33±1,76	98,33±1,45	108,67±2,03	96,33±1,45	86,67±1,76	73,67±2,03
Ext aq HS (250 mg/kg) + Glucose (3 g/kg)	96±1,15	93,67±1,45	115,33±1,76	85,33±1,45	73±1,73	59,33±1,20
Ext aq HS (500 mg/kg) + Glucose (3 g/kg)	94,33±1,20	91±1,53	112,33±1,45	82,67±1,73	71±1,15	57,33±1,45
Ext aq HS (1000 mg/kg) + Glucose (3 g/kg)	95,67±2,03	88,67±1,76	104,67±1,86	80,33±1,45	69,67±0,88	54,33±1,76
Metformin (250 mg/kg) +Ext aq HS (1000 mg/kg) + Glucose (3 g/kg)	92,67±1,45	105±1,15	92,67±1,76	79,67±1,20	66,67±2,03	51,33±1,45

Moyenne ±ESM, n=3.

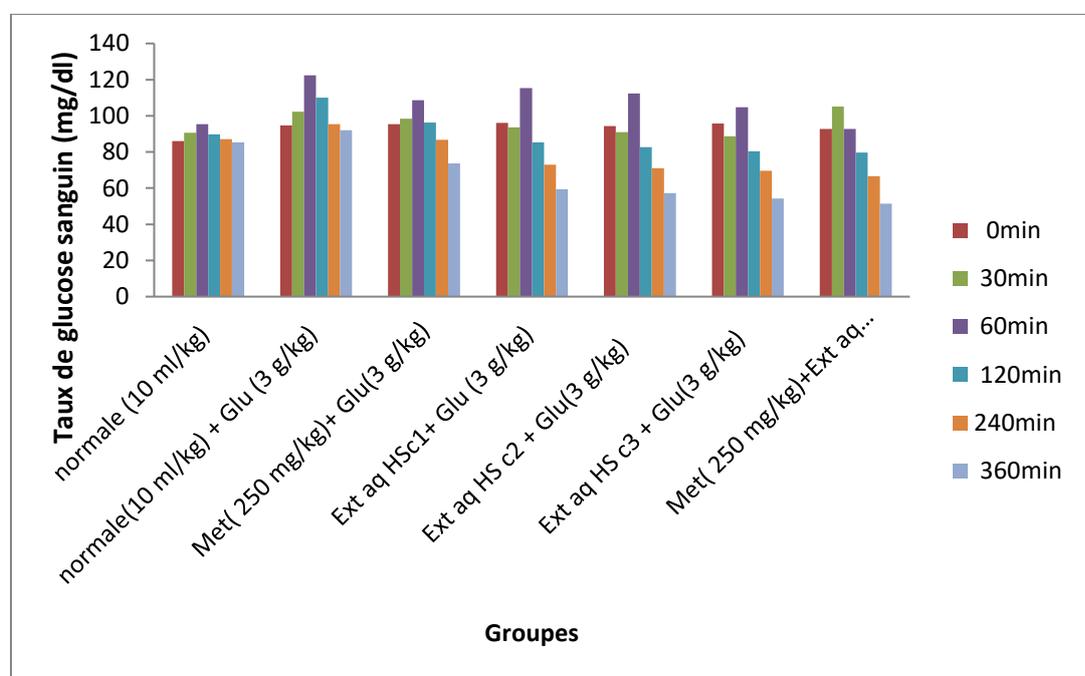


Figure.27 : Variations de la glycémie chez les souris normales traités par l'extrait aqueux à différentes concentrations et soumises à un test de tolérance orale au glucose.

HS : *Helichrysum stoechas*, c1=250mg/kg, c2=500mg/kg, c3=1000mg/kg, Met+ExeaqHSc3
 combinaison entre 1000 mg de *H stoechas* et 100mg de metformine

III.8.2. Effet à long terme (sub-aigüe) de l'extrait aqueux décocté chez les souris normales

Les résultats des effets de trois doses (250, 500 et 1000mg/kg) de l'extrait aqueux décocté, la metformine et le groupe témoin chez les souris normo-glycémique sont enregistrés (Tab. 20). La dose de la metformine a montré une diminution significative ($P < 0,05$) du glucose dans le sang le troisième jour. La dose de 250mg/kg de poids corporel a significativement ($P < 0,05$) diminué le taux de glucose dans le sang à partir de 5 jours de traitement. Cependant, la dose de 1000mg/kg a diminué de manière significative le taux de glucose sanguin qui atteint 52,33mg/dl au 10^{ème} jour de traitement.

L'association de la dose (1000mg/kg) et la metformine (250mg/kg) a montré une baisse très importante de la glycémie (-41,83%) par rapport au médicament de référence seul (-28,23%)

Tableau. 20 : L'effet anti-hyperglycémique de l'extrait aqueux décocté (Ext aq HS), standard et leur combinaison chez les souris normo-glycémiques traitées à long terme

Traitement	Le taux de glucose sanguin (mg/dl)					% de variation de glucose
	Jour0	Jour3	Jour5	Jour7	Jour10	
Eau saline (10 mL/kg)	85,33 ±1,20	90,67±1,45	92,33±1,76	88,33±1,86	89,33±2,03	(4,68)
Metformine (250 mg/kg)	82,67±1,45	73±1,15	65,6±2,19	61,33±0,88	59,33±1,20	(-28, 23)
Ext aq HS (250 mg/kg)	83,67±1,76	85,33±1,45	75,67±2,03	69.67±1,76	61±1,53	(-27,09)
Ext aq HS (500 mg/kg)	85,67±0,88	80±1,15	64,67±2,18	60,33±1,45	56,67±1,20	(-33,82)
Ext aq HS (1000 mg/kg)	84,33±0,88	71,33±1,45	60,33±1,20	58,67±0,88	52,33±1,45	(-37,95)
Metformine (250 mg/kg) +Ext aq HS (1000mg/kg)	83,67±1,45	69,67±1,76	57,67±0,88	53,33±1,45	48,67±1,20	(-41,83)

III.8.3 Effet anti hyperglycémiant d'extrait aqueux décocté chez les souris rendues diabétiques.

L'alloxane monohydraté est dérivé de l'urée et induit le diabète par nécrose sélective des cellules bêta-pancréatiques de Langerhans. Ceci a donc des effets sur la synthèse et la libération de l'insuline endogène, la rendant biologiquement indisponible ou insuffisante et donc entraînant une hyperglycémie (Szkudelski , 2001 ; Singh et Pathak, 2015)

III.8.3.1. Évolution de la glycémie à court terme (aigüe)

L'influence de l'extrait aqueux de l'*H. stoechas* sur la glycémie a été suivie (Tab. 21, Fig. 28). Dès la quatrième heure du traitement par les différentes concentrations (250, 500 et 1000 mg/kg) de l'extrait aqueux d'*H. stoechas*, une diminution significative de la glycémie chez les souris diabétiques traitées est remarquée. Chez les souris normales, par contre, la glycémie reste normale.

Tableau.21 : L'effet de l'extrait aqueux décocté (Ext aq HS), standard et leur combinaison sur les niveaux de glucose sanguin (mg/dl) chez les souris diabétiques induites par l'alloxane à courte terme

Groupes et Traitement glucose	Le taux de glucose sanguin (mg/dl)					% de variation de
	0	1hr	2hr	4 hr	6 hr	
Normale (Eau saline)	86 ±1,73	95,33±1,76	89,67±1,45	87±1,15	85,33±1,52	(-0,77)
Diabetique (Eau saline)	275 ±1,15	278 ± 1,53	266±1,73	261,33± 2,03	258± 2,08	(-6,18)
Diabetique(Metformine) (250mg/kg)	263,67±2,03	234,67±1,45	209±2,08	179±2,65	112,33±1,45	(-57,40)
DiabetiqueExt aqHS (250 mg/kg)	272,33±1,76	252,33±1,45	226±2,31	199,67±2,60	133±2,08	(-51,16)
DiabetiqueExt aqHS (500 mg/kg)	276,67± 2,33	237,67± 1,45	225,33±2,40	140± 2,31	115,33± 2,91	(-58,31)
Diabetique Ext aq (1000mg/kg)	273,67±2,03	224,67± 2,33	221,33±2,60	134±2,31	101,67±2,03	(-62,85)
DiabetiqueExt aqHS (1000mg/kg) et Metformine (250 mg/kg)	260,67±1,76	225,67±1,45	179,67±1,76	129±2,08	93±1,73	(-64,32)

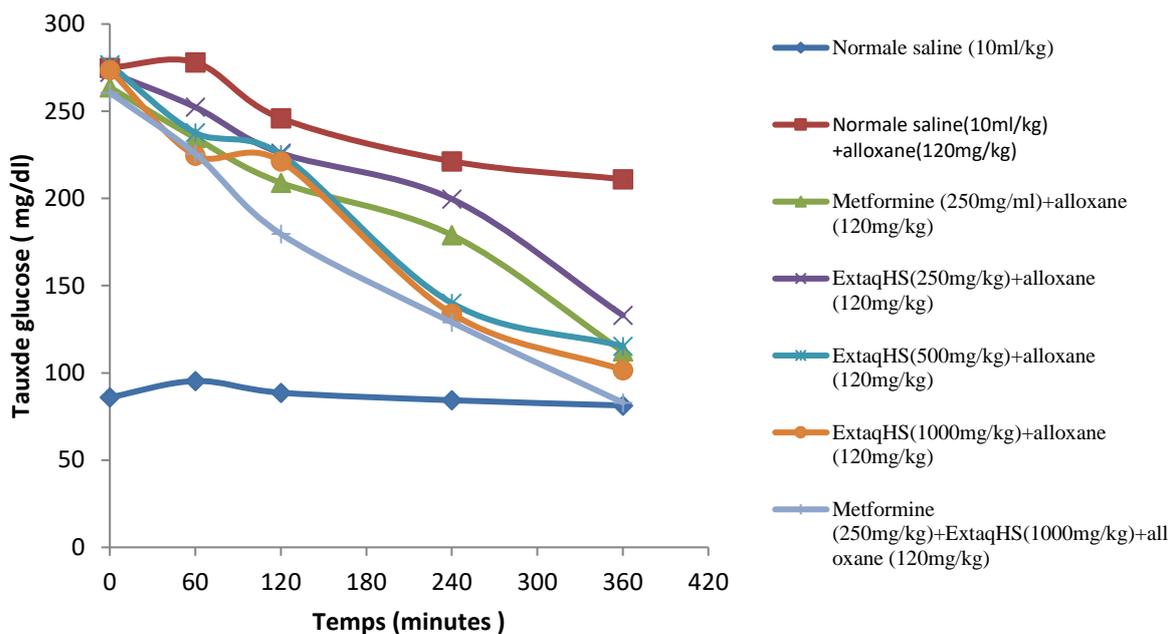


Figure.28 : Variations de la glycémie à court terme chez les souris rendues diabétique par alloxane et traitées par l'extrait aqueux de *H. stoechas* à différentes concentrations et la metformine. Chaque point représente la moyenne \pm SEM (n= 3).

III.8.3.2. Évolution de la glycémie à long terme chez les souris rendues diabétique

Les résultats montrent que dans le groupe diabétique non traité, les taux de glucose sont plus élevés que ceux du groupe contrôle sain (Tab.22, Fig. 29). Une baisse dans le niveau du glucose sanguin a été observé à partir du 3^{ème} jour après le traitement des souris diabétiques tant pour les différentes doses de l'extrait aqueux décocté d'*H. stoechas* que pour le groupe traité avec le médicament de référence. Le traitement par l'extrait aqueux à la dose de 1000 mg/kg p.c. a montré une baisse plus efficace de la glycémie (- 62,84%) comparable au médicament de référence (- 59,97%). La combinaison entre la metformine (250mg/kg.p.c) et l'extrait aqueux à la dose 1000mg/kg.p.c a provoqué une réduction très significative de taux du glucose par rapport au groupe diabétique non traité.

Durant la première semaine, nous avons enregistré chez les souris diabétiques traitées à la dose 250mg/kg une diminution progressive de la glycémie à partir du troisième jour et atteint 1,24 g/l à la fin de l'expérimentation. Pour les souris diabétiques non traités, l'augmentation de la glycémie entraîne la mort des souris de ce lot. En revanche, pour les souris traitées avec la combinaison de l'extrait et du médicament nous avons remarqué un changement significatif de la glycémie. Celle-ci reste dans les limites normales pour les témoins négatifs.

Tableau.22 : L'effet de l'extrait aqueux décocté (Ext aq HS), standard et leur combinaison sur les niveaux de glucose sanguin (mg/dl) chez les souris diabétiques induites par l'alloxane à long terme

Groupes et Traitement	Le taux de glucose sanguin (mg/dl)			% de variation de glucose		
	Jour0	Jour3	Jour5	Jour7	Jour10	
Normale (Eau saline)	85,33 ±1,45	90,67±1,45	92,33±1,76	88,33±1,86	89,33±1,33	(4,69)
Diabetique (Eau saline)	250 ±1,15	240 ± 1,53	243,33±1,45	2390± 1,20	237± 1,73	(-6)
Diabetique(Metformine) (250mg/kg)	230,67±1,20	179,67±1,76	142±1,15	134,33±1,45	92,33±1,20	(-59,97)
DiabetiqueExt aqHS (250 mg/kg)	246,33±1,45	191±1,53	152,33±1,86	146,67±2,03	124,67±0,88	(-49,39)
DiabetiqueExt aqHS (500 mg/kg)	238,67± 1,86	180,67± 1,76	130,33±1,20	122± 2,08	102,33± 1,20	(-57,12)
Diabetique Ext aqHS (1000mg/kg)	233,67±1,45	165,67± 1,76	121,33±0,88	107±1,15	87,67±1,20	(-62,84)
DiabetiqueExt aqHS (1000mg/kg) et Metformine (250mg/kg)	229,67±1,76	159,00±1,73	112,33±1,45	97,33±1,86	73±1,15	(-68,22)

III.8.3.3. Les effets des extraits sur les poids corporels des souris diabétiques induits par Alloxane.

Le suivi régulier du poids corporel des souris normaux témoins et diabétique témoins et diabétique traités par les différentes doses de l'extrait aqueux, nous a amené d'obtenir les résultats représentés dans le (Tab.23)

L'effet de l'extrait Aqueux sur l'évolution du poids corporel des souris normales et diabétiques, durant 10 jours de traitement est montré sur la figure 06. Le poids des souris traitées par l'extrait Aqueux a changé durant les 10 jours du traitement, et il a suivi le même profil que les souris témoins, sans aucune différence significative. En revanche chez les souris diabétiques que soit celles traitées par l'extrait Aqueux ou la metformine, le poids des souris a significativement diminuées au 3^{ème} jours de traitement.

Un gain régulier de poids corporel a été observé dans les groupes traités par le médicament metformine et aux extraits de différentes concentrations ainsi que pour le groupe de mélange entre le metformine et la dose 1000mg/kg de l'extrait.

Les groupes diabétiques traités ont montrés un signe de rétablissement dans le poids corporel, qu'à partir de 5^{ème} jours du traitement, une augmentation modérée de poids des souris est observée. Après 10 jours, le poids corporel de groupe normal (NC) a été significativement augmenté de 19.88% par rapport au groupe diabétique (P <0,05).

Tableau23 : L'effet de l'extrait aqueux décocté (Ext aq HS), standard et leur combinaison sur le poids corporel chez les souris diabétiques induites par l'alloxane

Groupes et Traitement	le poids corporels		% de variation de poids		
	Jour0	Jour3	Jour5	Jour7	Jour10
Normale (Eau saline)	28,33 ± 0,608	30,20 ± 0,473 (5,96)	31,60 ± 0,529 (10,88)	32,52 ± 10,736 (14,09)	34,17 ± 0,433 (19,88)
Diabetique (Eau saline)	36,23 ± 1,033	34,47 ± 0,669 (-4,88)	34,77 ± 1,037 (-4,05)	35,70 ± 0,802 (-1,47)	35,33 ± 0,960 (-2,76)
Diabetique(Metformine) (250mg/kg)	27,5 ± 0,321	26,23 ± 0,240 (-4,61)	28,27 ± 0,491 (2,79)	29,57 ± 0,617 (7,52)	31,5 ± 0,557 (14,55)
DiabetiqueExt aqHS (250 mg/kg)	26,87 ± 0,481	26,30 ± 0,153 (-2,11)	27,2 ± 0,208 (1,24)	31,27 ± 0,448 (16,38)	32,4 ± 0,4 (20,60)
DiabetiqueExt aqHS (500 mg/kg)	27,77 ± 0,328	26,67 ± 0,145 (-3,96)	29,43 ± 0,546 (6,00)	32,17 ± 0,713 (15,85)	33,5 ± 0,635 (20,65)
Diabetiquee Ext aqHS (1000mg/kg)	28,6 ± 0,643	27,67 ± 0,521 (-3,26)	30,27 ± 0,633 (5,83)	31,23 ± 0,612 (9,21)	34,10 ± 0,781 (19,23)
DiabetiqueExt aqHS (1000mg/kg) et Metformin (250 mg/kg)	31,83 ± 0,780	30,63 ± 0,722 (-3,92)	34,3 ± 0,462 (5,72)	37,63 ± 0,353 (15,36)	38,8 ± 0,361 (18,98)

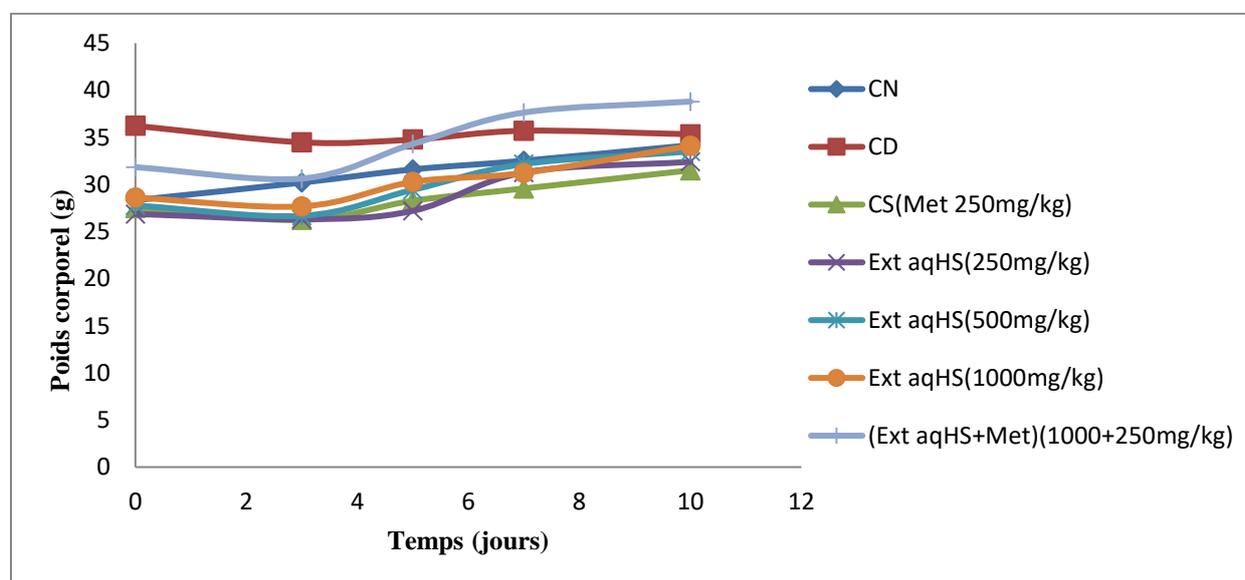


Figure.29 : Evolution du poids corporel en (g) chez les souris diabetiques (témoins et expérimentaux) soumis à l'administration orale de différentes doses d'extrait aqueux durant 10 jours.

En comparaison avec le groupe CD, les poids corporels étaient significativement augmentés ($P < 0,05$) dans tous les groupes traités. Au contraire, le groupe diabétique non traité a montré une chute progressive significative dans le poids corporel durant toute la période expérimentale.

Le pancréas est l'organe primaire impliqué dans la détection des états diététiques et énergétiques de l'organisme via la concentration de glucose dans le sang et en réponse à une glycémie élevée, l'insuline est sécrétée. L'alloxane est l'une des substances usuelles utilisées pour l'induction du diabète sucré chez une grande variété d'espèces en endommageant les cellules sécrétrices d'insuline du pancréas. Cela endommage un grand nombre de cellules β , résultant en diminution de la libération d'insuline endogène, ce qui ouvre la voie à la diminution de l'utilisation du glucose par les tissus (Sharma *et al.*, 2010). Le diabète induit par l'alloxane est caractérisé par une perte sévère de poids corporel et similaires les résultats ont également été observés dans la présente étude. Cette perte de poids corporel pourrait être due à la déshydratation et le catabolisme des graisses et des protéines, ces réactions cataboliques accrues conduisant à l'amaigrissement musculaire des souris diabétiques (Rajagopal et Sasikala, 2008). Dans cette étude, les groupes traités à l'extrait aqueux ont montré une prévention significative de la perte de poids corporel, qui pourrait être le résultat de capacité à réduire l'hyperglycémie.

Malgré l'activité de metformine dans l'expérience TTOG et normo-glycémique est notée, les différentes concentrations de l'extrait possèdent un fort effet inhibiteur sur les niveaux de glucose dans le sang par rapport au metformine. En outre, dans les tests diabétiques aiguë et subaiguë, l'activité des extraits a été trouvée efficace. D'autre part, la metformine est plus efficace dans l'expérience TTOG que dans les tests diabétiques aigus. Selon Aslan *et al.* 2007a, l'administration des extraits aqueux et éthanoliques de *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* à long termes aux rats diabétiques par streptozotocine, montre qu'ils sont plus efficaces dont la réduction de taux de glucose que le médicament de référence (Tolbutamide). Dans l'expérience TTOG, la Tolbutamide possède un effet inhibiteur plus élevé sur la concentration de glucose dans le sang que les extraits de *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* testés. Les mêmes résultats ont été déterminés pour des extraits aqueux et éthanoliques de *Helichrysum graveolens* (Aslan *et al.*, 2007b).

Njagi *et al.*, (2015) ont souligné que l'administration orale de 150 mg/kg p.c d'extrait aqueux décocté d'*Helichrysum odoratissimum* durant 4heures, réduit significativement

l'hyperglycémie chez les souris rendues diabétiques par l'alloxane, aussi efficace que l'insuline. Cette réduction est dépendante de la dose. Njagi *et al.*, (2012) ont démontré des effets hypoglycémiques sans dépendance à la dose d'extraits aqueux d'écorce de *Kleinia Squarrosa* chez des souris diabétiques induites par l'alloxane. Cette tendance pourrait suggérer que l'extrait a été absorbé dans le système cellulaire par transport actif où une saturation particulière de la concentration de l'extrait s'est produite, ce qui a entraîné son excrétion.

Plusieurs autres études sur l'effet hypoglycémiant et anti hyperglycémiant d'autres espèces de la même famille ou familles différentes ont été publiées :

Mukhtar *et al.*, (2013) ont indiqué que l'extrait éthanolique de fleurs d'*Artemisia maritima* possède une importante activité hypoglycémique pendant les phases aiguë et subaiguë de traitements et qu'elle dépend de la dose de l'extrait.

Pérez *et al.*, (2003) ont montré que l'administration intrapéritonéale d'extrait aqueux et l'extrait chloroformique des feuilles de *Ficus carica* peuvent réduire la glycémie chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine. Ils suggèrent que l'administration des extraits de *Ficus carica*, riche en flavonoïdes et polyphénols, influence sur le stress oxydatif (libération des radicaux libres) chez les diabétiques.

L'effet hypoglycémiant observé peut être dû à la diminution de gluconéogenèse ou l'augmentation des niveaux transporteurs de glucose et la stimulation de l'absorption dans les tissus ce dernier est confirmé *in vitro*. Un autre effet de l'extrait de plante peut être qu'il conserve les fonctions des cellules des îlots de Langerhans (cellules β), amélioration de la sensibilité des tissus cibles de l'insuline ce qui conduit à une augmentation significative de l'insuline ou à l'amélioration de la régulation du métabolisme du glucose (Hassan *et al.*, 2018).

L'analyse phytochimique de la plante a révélé la présence de flavonoïdes qui pourraient être responsables de l'effet hypoglycémiant d'*H. stoechas* (Les *et al.*, 2017 ; Silva *et al.*, 2017).

Cette étude a impeccablement démontré l'utilisation de l'extrait de la partie aérienne d'*H. stoechas* dans la gestion du diabète sucré chez les souris diabétiques induites par l'alloxane. On peut déduire que, *H. stoechas* est riche en nombreux constituants qui sont pharmacologiquement actifs et qui peuvent être utilisés dans diverses fins thérapeutiques comme le traitement du diabète sucré.

III.9. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

III.9.1. Stabilisation membranaire des hématies

Dans cette étude, l'extrait éthanolique (EtOH_(S)) des parties aériennes (feuille, fleurs) de *H. stoechas* à une concentration de 50 à 1000 µg/mL protège de manière significative la membrane des érythrocytes contre la lyse induite par une solution hypotonique et la chaleur par rapport au contrôle (Tab.24, Tab.25 ; Fig. 30, Fig.31). Dans l'hémolyse induite par la chaleur et l'hypotonie, à une concentration de 1000 µg /mL, l'extrait a produit une inhibition de 87,68%, 82,06% de l'hémolyse des hématies par rapport à 91,11%, 89,25% produit par le diclofénac sodique respectivement à la même concentration.

Aussi, nous constatant que lorsque la concentration augmente, la vitesse d'hémolyse diminue et la protection des membranes augmente, ce qui suggère que la stabilisation membranaire suit une relation dose- réponse.

Tableau.24 : Effet de l'extrait éthanolique de *H. stoechas* et de diclofenac sodique sur la lyse membranaire des hématies induite par une solution hypotonique

Traitement	Concentration (µg/mL)	absorbance (560nm)	% inhibition	IC ₅₀ (µg/mL)
Contrôle		0,667±0,012	0	
EtOH _(S)	50	0,457±0,003***	31,48	78,5
EtOH _(S)	100	0,289±0,001***	56,66	
EtOH _(S)	250	0,246±0,002***	63,10	
EtOH _(S)	500	0,185±0,002***	72,25	
EtOH _(S)	1000	0,119±0,001***	82,06	
DIC	50	0,350±0,003***	47,50	54
DIC	100	0,264±0,001***	60,35	
DIC	250	0,168±0,002***	74,85	
DIC	500	0,087±0,001***	87	
DIC	1000	0,072±0,001***	89,25	

Les valeurs sont les moyennes ± SEM, (n = 3); *** p <0,0001, test Dunnett comparé par rapport au contrôle.

Tableau.25 : Effet de l'extrait éthanolique de *H. stoechas* et de diclofenac sodique sur la lyse membranaire des hématies induite par la chaleur

Traitement	Concentration (µg/mL)	absorbance (560nm)	% inhibition	IC ₅₀
Contrôle		0,525±0,001		
EtOH _(s)	50	0,300±0,001***	42,85	45,5
EtOH _(s)	100	0,169±0,001***	67,74	
EtOH _(s)	250	0,109±0,001***	79,23	
EtOH _(s)	500	0,084±0,001***	84,06	
EtOH _(s)	1000	0,065±0,002***	87,68	
DIC	50	0,225±0,002***	57,14	60
DIC	100	0,132±0,001***	74,79	
DIC	250	0,106±0,001***	79,74	
DIC	500	0,076±0,001***	85,46	
DIC	1000	0,047±0,003***	91,11	

Les valeurs sont les moyennes ± SEM, (n =3); *** p <0,0001, test Dunnett comparé par rapport au contrôle.

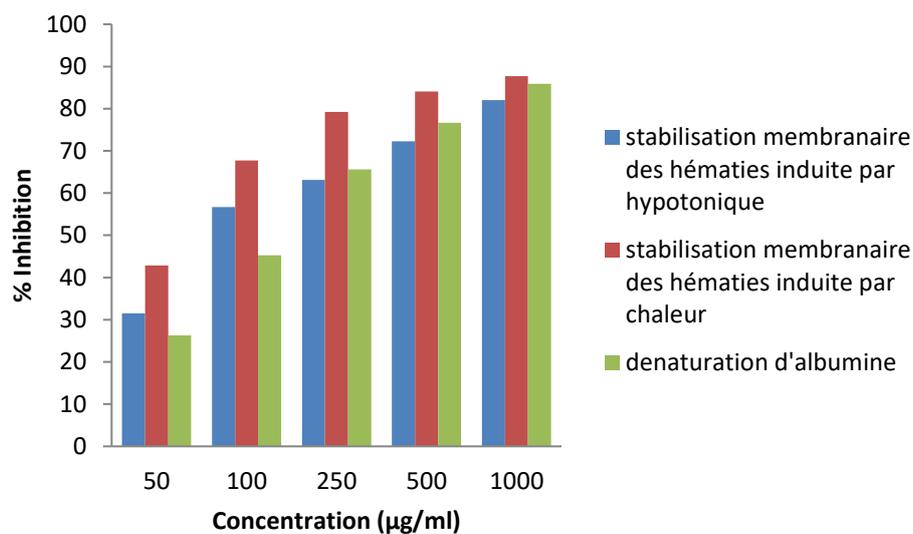


Figure.30 : Effet de l'extrait de *H. stoechas* sur la stabilisation membranaire des hématies et dénaturation d'albumine.

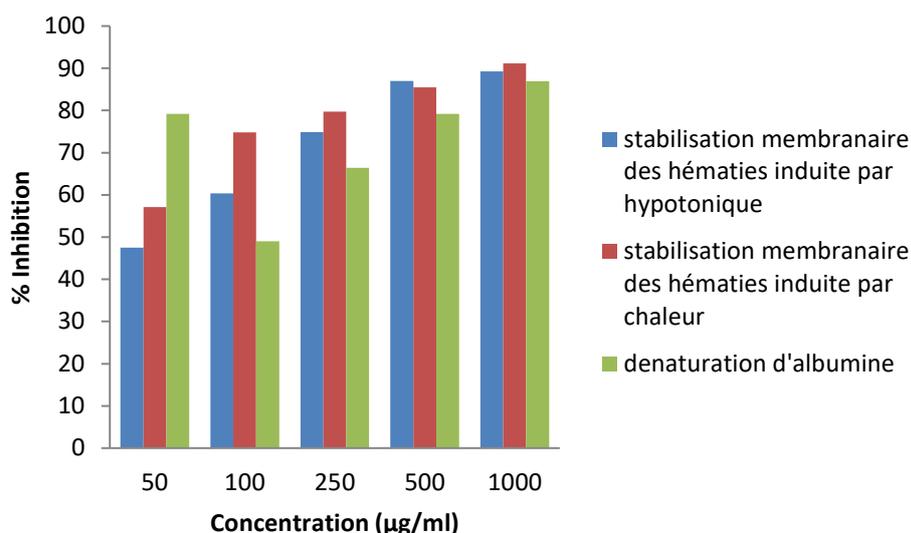


Figure.31 : Effet de diclofenac de sodium sur la stabilisation membranaire des hématies et dénaturation d'albumine

III.9.2. Dénaturation d'albumine

Ainsi, l'extrait éthanolique ayant manifesté une activité antioxydante importante, a été sélectionné pour l'évaluation *in vitro* de l'activité d'anti-arthritique. Les résultats ont révélé que l'extrait éthanolique a une activité anti-dénaturante significative. Des concentrations allant de 50 à 1000 µg /mL ont été testées pour l'inhibition de la dénaturation des protéines, l'extrait éthanolique d'*H. stoechas* à une concentration de 50 µg/mL donne un pourcentage d'inhibition de 26,15% et à 1000 µg/mL il est de 85,92% (Tab. 26, Fig. 32).

Tableau.26 : Effet d'extrait éthanolique de *H. stoechas* et de diclofenac sodique sur la dénaturation des protéines (albumine sérique bovine)

Traitement (µg/mL)	Concentration (µg/mL)	absorbance (660nm)	% inhibition	IC ₅₀
Contrôle		0,488±0,001		
EtOH _(s)	50	0,360±0,001***	26,29	130
EtOH _(s)	100	0,267±0,002***	45,28	
EtOH _(s)	250	0,168±0,001***	65,64	
EtOH _(s)	500	0,114±0,001***	76,63	
EtOH _(s)	1000	0,069±0,002***	85,92	
DIC	50	0,322±0,002***	34,01	101
DIC	100	0,249±0,001***	49,03	
DIC	250	0,164±0,001***	66,39	
DIC	500	0,101±0,001***	79,23	
DIC	1000	0,064±0,001***	86,88	

Les valeurs sont les moyennes ± SEM, (n = 3); *** p <0,0001

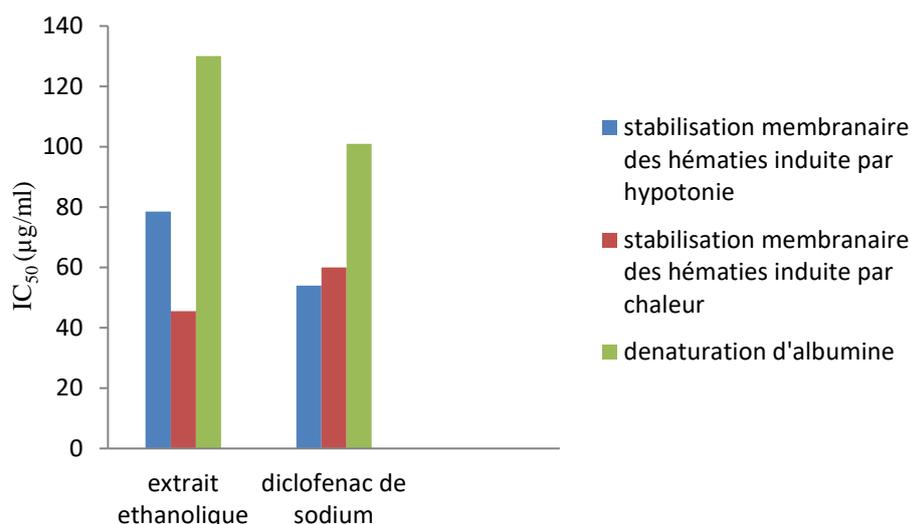


Figure.32 : Détermination des valeurs d'IC₅₀ de l'extrait éthanologique d'*H. stoechas* et du diclofenac de sodium par différentes méthodes anti-inflammatoires.

Dans cette méthode de dénaturation des protéines, la valeur IC₅₀ de l'extrait éthanologique est de 130µg/mL, le diclofénac a été utilisé comme standard pour comparer son activité antiarthritique à notre extrait, il a été trouvé qu'il peut offrir un potentiel anti-arthritique plus supérieur à l'extrait avec une valeur IC₅₀ de 101 µg/mL.

Les médicaments anti-inflammatoires agissent soit en inhibant les enzymes lysosomales (cyclo-oxygénase), soit en stabilisant la membrane lysosomale (Shirwaikar *et al.*, 2011). L'hémolyse des hématies induite par l'hypotonicité peut provenir du rétrécissement des cellules dû à la perte osmotique d'électrolyte intracellulaire et de composants de leurs fluides ou une lyse de sa membrane accompagnée d'oxydation de l'hémoglobine (Vadivu et Lakshmi, 2008). L'extrait éthanologique peut inhiber les processus qui peuvent stimuler ou améliorer l'efflux de ces composants intracellulaires, il peut ainsi être utilisé comme agent anti-inflammatoire.

La membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale et sa stabilisation implique que l'extrait peut stabiliser les membranes lysosomales. La stabilisation membrane de globule rouge dans un milieu hypotonique peut être considérée comme mesure *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire des médicaments ou des extraits de plantes (Hossain *et al.*, 2015). L'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanologique de *H. stoechas* peut être due à un constituant ou à l'effet synergique de plusieurs constituants phytochimiques tels que les flavonoïdes et les tanins qui y sont présents. Certains flavonoïdes possèdent une activité inhibitrice puissante contre une variété d'enzymes telles que la protéine kinase C, la protéine tyrosine kinase et la phospholipase A2 (Parvin *et al.*, 2015). L'enzyme phospholipase A2 est

connue pour être responsable de la formation des médiateurs inflammatoires comme les prostaglandines et les leucotriènes qui, en attirant des leucocytes au site d'inflammation entraînerait des dommages aux tissus probablement par la libération de radicaux libres. La phospholipase A2 hydrolyse les phospholipides dans la membrane cellulaire en acide arachidonique, qui est très rapidement métabolisé par la cyclo-oxygénase en prostaglandines qui sont des composants majeurs responsables de l'inflammation de la douleur (Shirwaikar *et al.*, 2011; Ramadevi *et al.*, 2014). D'après la littérature les radicaux libres peuvent nuire aux tissus environnants, initiant une peroxydation lipidique qui entraîne la destruction de la membrane. Les tissus endommagés provoquent une réponse inflammatoire par la production de médiateurs. Les agents piègeurs des radicaux libres peuvent être bénéfiques dans le traitement des troubles inflammatoires (Sen *et al.*, 2010).

La dénaturation est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire par application d'un stress externe ou d'un composé chimique comme un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou de la chaleur. La plupart des protéines perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées. La dénaturation des protéines tissulaires est l'une des causes des maladies inflammatoires et arthritiques. La production d'auto-antigènes dans certaines maladies arthritiques peut être due à la dénaturation de protéines *in vivo* (Madan *et al.*, 2011). Le mécanisme de dénaturation implique probablement une altération électrostatique d'hydrogène et du pont disulfure (Mishra *et al.*, 2011). Le diclofenac sodique (médicament anti-inflammatoire) et l'extrait éthanolique ont montré une capacité dépendant de la dose pour inhiber la dénaturation protéique induite thermiquement. Le même résultat a été observé pour les huiles essentielles d'*H. italicum* testées sur l'albumine d'œuf (Bouزيد et Zerroug, 2016).

De nombreuses études ont signalé l'effet anti-inflammatoire de plusieurs plantes médicinales dont *H. stoechas* (Recio *et al.*, 1991 ; Hwisa *et al.*, 2011) et *H. italicum* (Sala *et al.*, 2002) *in vivo*. Les extraits éthanoliques de *H. subglomeratum* et *H. nudifolium* ont inhibés la synthèse *in vitro* des prostaglandines et les extraits acétoniques de *H. excisum* et *H. felinum* ont inhibés l'enzyme 5-lipoxygénase qui joue également un rôle dans l'inflammation (Lourens *et al.*, 2008).

III.10. Détermination de l'activité antalgique, anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique
Ces dernières années, beaucoup de recherches se sont orientés vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de vérifier l'efficacité des plantes utilisées et d'établir une stratégie scientifique pour l'utilisation de ces plantes. Dans cette partie d'étude, l'objectif essentiel consiste à vérifier l'activité anti-inflammatoire et antalgique de l'extrait éthanolique obtenu par soxhelet de *H.stoechas*.

III.10. 1. Toxicité Aiguë

Après administration par gavage de l'extrait *éthanolique de H.stoechas* aux différents lots de souris à des concentrations variables (de 1000 à 6000mg/kg) aucun signe clinique particulier et aucun mort n'a été détecté dans les groupes de souris durant les 48h après l'administration et l'observation comme le montre le tableau.27.

Tableau.27 : Le taux de mortalité des souris en fonction de la dose de l'extrait *éthanolique* administrée

Différents lots	1	2	3	4	5
Nombres de souris	4	4	4	4	4
Dose administrée(mg/kg)	1000	2000	4000	5000	6000
Les signes de toxicité	-	-	-	-	-
Nombres de morts %	0	0	0	0	0

L'absence de souris mortes indique que l'extrait éthanolique administré par voie orale est dépourvu de toxicité aiguë chez les différents lots de souris. Cette absence de toxicité aiguë est aussi observée avec d'autres plantes de même genre tel que *Helichrysum italicum*, *Helichrysum arenarium* subsp *aucheri*, *Helichrysum pilicatum* subsp *pilicatum*, *Helichrysum noeanum* et *H. odoratissimum* (Küpeli *et al.*, 2006 ; Tatli *et al.*, 2009 ; Njagi *et al.*, 2015)

III.10.2. Effet anti-œdémateux

L'effet anti-œdémateux de l'extrait éthanoliques des parties aériennes de *H.stoechas* a été démontrée à des doses de 250, 500, 1000 mg / kg pc (Tab.28). L'administration de l'agar 2% entraîne une inflammation très visible avec une augmentation du volume des pattes des souris témoins à partir de la première heure de l'expérimentation. De plus, une augmentation significative du volume de la patte des souris est observée à la deuxième heure comparée à toutes les heures de l'expérimentation (Fig.17).

A la quatrième heure, l'extrait éthanolique a réduit significativement l'œdème ($p < 0,05$) à la dose de 1000 mg/kg et montre un pourcentage d'inhibition de 72,09%. Cette inhibition de l'œdème a été plus efficace que ceux obtenus avec diclofénac 100mg/kg au cours de la

même période, on provoquant une baisse de l'œdème qui suit une cinétique croissante et atteint une valeur de 67,44 au bout de 4 heures.

Une combinaison de diclofinaque sodique (100 mg /Kg de PC) et l'extrait (1000 mg/Kg de PC mg) a montré l'effet inhibiteur maximal de l'ordre de 76.74%.

Après quatre heures d'expérimentation l'augmentation du volume des pattes des souris traitées est significativement diminué comparé à celui de deuxième et troisième heure ($p < 0.001$). Pour cela, nous pouvons dire que l'extrait éthanolique présente une activité anti-inflammatoire à dose dépendante (Fig. 33, Fig. 34).

Tableau.28 : Variation des volumes moyens et le pourcentage d'inhibition des pattes de souris traitées avec diclofenac, extrait éthanolique *et leur combinaison*

Groupes	Augmentation du volume de la patte ΔV_{mL} (Pourcentage d'inhibition (%))				
	0 h	1 h	2 h	3h	4h
Normale 10mL/kg NaCl(0,9%)sans Agar	0,22 \pm 0,015	0,24 \pm 0,013	0,28 \pm 0,015	0,25 \pm 0,016	0,23 \pm 0,016
Contrôle 10mL/kg Négatif +(2% Agar)	0,23 \pm 0,013	0,55 \pm 0,011	0,89 \pm 0,031	0,92 \pm 0,026	0,86 \pm 0,018
Dic 100 mg/kg + (2% Agar)	0,24 \pm 0,015	0,32 \pm 0,014 (41, 81)	0,39 \pm 0,019 (56,18)	0,33 \pm 0,008 (64,13)	0,28 \pm 0,016 (67,44)
EtOH(S) 250 mg/kg + (2% Agar)	0,26 \pm 0,013	0,40 \pm 0,014 (27,27)	0,43 \pm 0,013 (51,69)	0,37 \pm 0,008 (59,78)	0,30 \pm 0,006 (65,12)
EtOH(S) 500 mg/kg + (2% Agar)	0,25 \pm 0,010	0,33 \pm 0,007 (40)	0,38 \pm 0,009 (57,3)	0,35 \pm 0,007 (61,96)	0,27 \pm 0,008 (68,6)
EtOH(S)1000 mg/kg + (2% Agar)	0,24 \pm 0,02	0,28 \pm 0,011 (49,09)	0,34 \pm 0,05 (61,80)	0,29 \pm 0,06 (68,48)	0,24 \pm 0,04 (72,09)
EtOH(S) 1000 mg/kg +Dic 100 mg/kg + (2% Agar)	0,21 \pm 0,008	0,24 \pm 0,009 (56,36)	0,32 \pm 0,009 (64,04)	0,26 \pm 0,010 (71,74)	0,20 \pm 0,004 (76,74)

* Réduction de l'œdème significatif à $p < 0,05$ par rapport au contrôle. Les valeurs d'œdème présentées sont les moyennes \pm SEM ($n = 4$). Les valeurs entre parenthèses sont le pourcentage d'inhibition de l'œdème calculé par rapport au contrôle.

Il est connu que l'agent responsable d'œdème de patte peut intervenir aux nombreux médiateurs qui induisent la réaction inflammatoire à deux phases différentes. La phase initiale est attribuée à la libération de médiateurs tels que l'histamine, la sérotonine et de la bradykinine à partir des mastocytes. La deuxième la phase qui implique l'infiltration des neutrophiles et la libération de prostaglandines, protéase et les cytokines dans les tissus (Coura *et al.*, 2015).

En outre, les extraits éthanoliques se sont révélés contenir des polyphénols, des stéroïdes, des flavonoïdes et les tanins, par dépistage phytochimique préliminaire qui peuvent provoquer une inhibition de l'histamine, la sérotonine ou la synthèse des prostaglandines. Considérant

que la production de métabolites de l'acide arachidonique est le principal facteur responsable de la première et de la seconde phase de la réponse inflammatoire, nos résultats suggèrent que l'effet anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *H. stoechas* pourrait être lié à l'inhibition de la libération ou de la synthèse des produits de la cyclo-oxygénase.

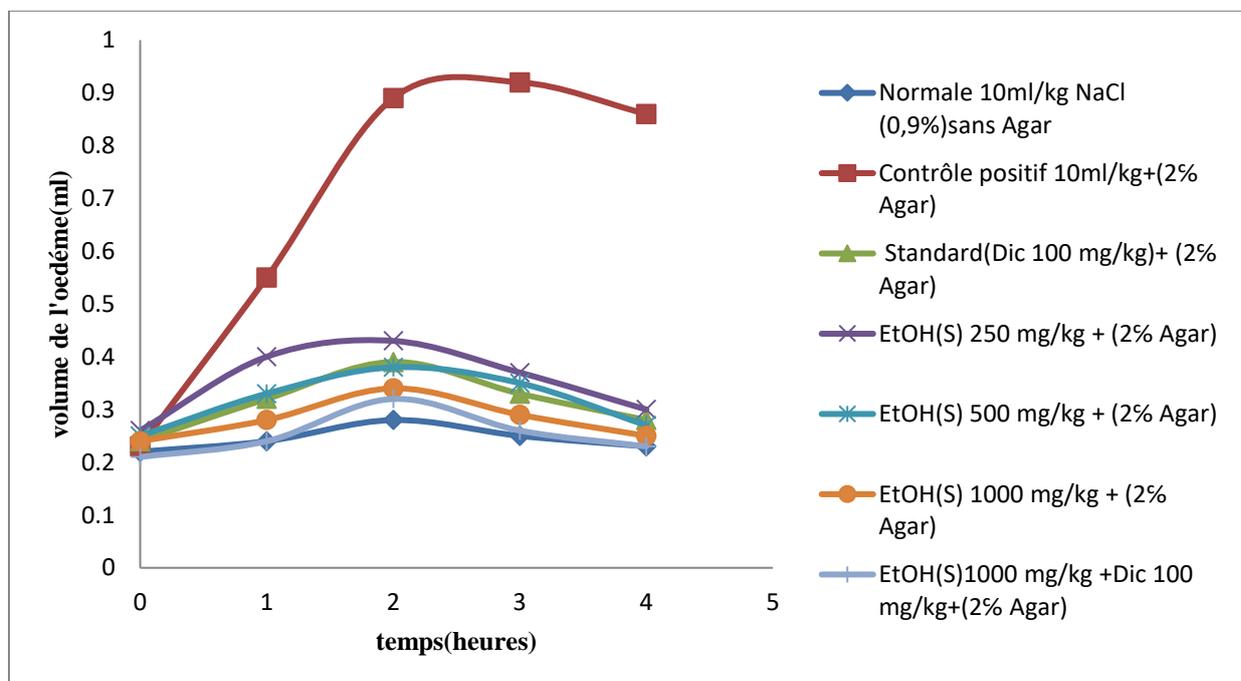


Figure.33 : Evolution de l'œdème ($m \pm SEM$) en présence d'un traitement de l'extrait éthanolique et diclofenac et leur mélange par voie orale, après l'injection de 2% d'agar, $n= 4$ souris

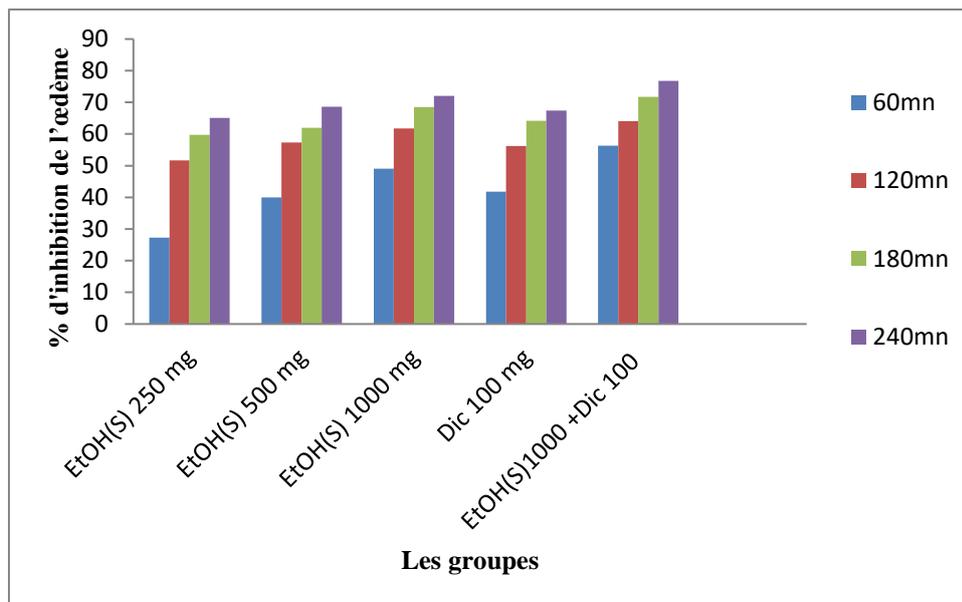


Figure.34 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème des pattes des souris, induit par 2% d'agar, après les différents traitements lors du test de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique en comparaison à la référence diclofenac (Dic)

III.10.3. Effet anti douloureux (activité analgésique)

L'activité analgésique de l'extrait éthanolique de la plante a été évaluée à l'aide de la méthode de l'immersion de la queue, la plaque chaude et le test de torsion chez la souris. Les méthodes de la plaque chaude et l'immersion de la queue sont utiles pour détecter les analgésiques à action centrale, tandis que l'acide acétique pour détecter les effets analgésiques périphériques par la libération de substances endogènes, qui excitent alors les terminaisons nerveuses de la douleur.

III.10.3.1. Le test l'immersion de la queue

Dans cette étude, l'extrait éthanolique a prolongé le temps de réaction après l'immersion de la queue de souris dans l'eau chaude. Les différentes concentrations (250, 500 et 1000 mg/kg) de l'extrait éthanolique et 100 mg/kg de paracétamol et la codeine ont montrées un effet analgésique assez important aux 90^{ème} minutes après leur administration, cette activité est significativement plus efficace pour le groupe traité avec la combinaison entre le traitement et l'extrait à 1000mg/kg ($49,43 \pm 0.557$ sec) comparé aux autres traitements.

A partir de la 120^{ème} minutes, le temps de latence commence à diminuer pour tous les traitements jusqu'à revenir à l'état initial après la 180^{ème} minutes. Ce temps de réaction était

comparable au Paracétamol +codéine, mais beaucoup plus inférieure à celle de leurs combinaison avec l'extrait à 1000mg/kg (Tab. 29 ; Fig. 35).

Tableau.29 : Influence de l'extrait éthanolique, le Paracétamol +codéine et leur combinaison vis-à-vis de la douleur induite par la chaleur (le test de l'immersion de la queue des souris).

Temps moyen de réaction (seconde) avant et après l'administration de l'extrait et le médicament								
Groupes	Dose (mg/kg)	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Normale NaCl (0,9%)	10mL/kg	8,41±0,061	9,21±0,099	10,72±0,215	11,80±0,460	10,17±0,077	9,2±0,029	8,66±0,191
Paracétamol +codéine	100	10,42±0,212	30,25 ±1,931	35,75 ±1,75	42,75 ±2,287	29,10 ± 0,435	19,80 ±0,474	15,64±0,349
EtOH(S)	250	11,32±0,472	23,67 ±0,692	28,23 ±1,463	34,63 ±0,447	27,54±1,117	17,27 ±0,451	9,35±0,611
EtOH(S)	500	11,67±0,078	26,21 ±0,751	33,75 ±1,75	38,95 ±1,020	30,39 ±1,644	24,17 ±0,429	13,47±0,316
EtOH(S)	1000	10,68±0,287	28,26 ±1,224	36,38 ±0,413	43,20 ±1,079	32,25± 0,854	25,73±0,419	14,30±0,531
EtOH(S)+Paracétamol +codéine 100	1000	9,17±0,128	37,17± 0,456	44,50 ±0,699	49,43 ±0,557	40,38 ± 0,466	31,29±0,389	19,78±0,753

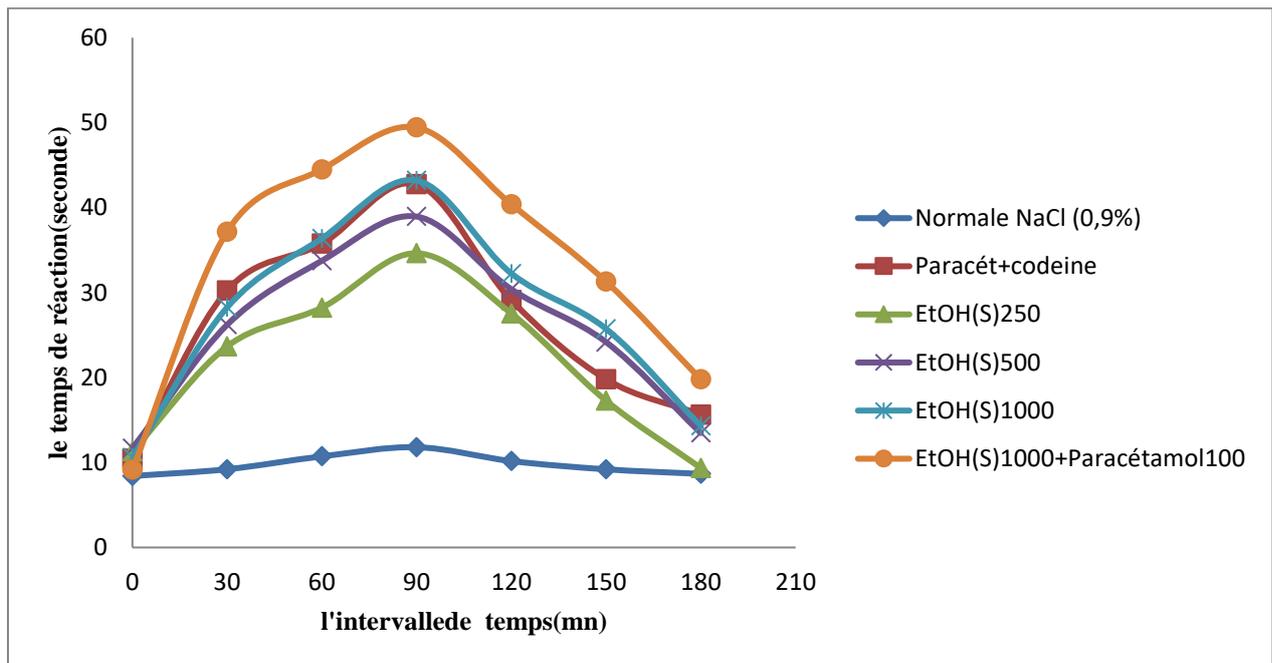


Figure.35 : Temps de réponse des souris aux extraits éthanoliques, paracetamole + codeine et leur combinaison à différents intervalles de temps par la méthode d'immersion de la queue des souris, (n=4).

III.10.3.2. Le test de la Plaque chaude

Dans la méthode de plaque chaude, l'extrait d'éthanol de *H. stoechas* à des doses de 250, 500 et 1000 mg / kg a montré une augmentation significative du temps de réaction par rapport au groupe témoin dans les 30, 60, 90, 120,150 et 180 minutes après l'administration du l'extrait qui était comparable à la drogue standard Paracétamol+codéine . Le temps de réaction maximum a été trouvé à 120 minutes pour les trois doses de l'extrait ($32,25 \pm 4,72$, $36,57 \pm 4,33$ et $41,88 \pm 5,61$ respectivement), le mélange de médicament et l'extrait de la plante prolonge le temps de la sensibilité des souris à la chaleur (Tab. 30, Fig. 36).

Au même période Hwisa *et al.* (2011) ont constaté qu'à la dose 800mg/kg, le temps de réaction est de $13 \pm 3,19$, ceci confirme que notre extrait possède un fort effet analgésique contre la chaleur mieux que celui de *Helichrysum stoechas* d'origine Aljabal Algharby-Libya. L'activité analgésique qui se manifeste par l'extrait est apparentée aux constituants polaires et semi-polaires de la plante (tanins, flavonoïdes et saponines)

Les valeurs de la moyenne du temps de réaction minimum à la douleur induite par la chaleur d'une plaque chauffante sont indiquées dans le tableau.30.

Tableau.30 : Détermination de l'effet de l'extrait ethanologique, le Paracétamol +codéine et leur combinaison sur les souris par le test de la plaque chauffante.

Groupes Dose (mg/kg)	Temps moyen de réaction (seconde) avant et après l'administration de l'extrait et le médicament et leur combinaison							
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	240
Normale NaCl (0,9%) 10mL/kg	9,22±0,070	10,14±0,058	10,36±0,053	10,60±0,028	11,37±0,039	9,13±0,019	9,04±0,017	8,86±0,089
Paracétamol +codéine 100	11,34±0,117	25,76 ± 0,354	30,72± 0,641	34,33 ± 0,881	39,25 ± 0,678	33, 28 ± 0,573	23,10±0,376	14,67±0,298
EtOH(S)250	10,10±0,037	17,10± 0,755	22,95± 0,197	28,67± 0,202	32,50± 0,821	21,50±0,645	16,67±0,195	11,20±0,537
EtOH(S)500	10,93±0,226	24,5± 0,317	27,78± 0,530	31,30± 0,871	35,57± 0,459	29,50± 0,232	18,66±0,501	12,75±0,408
EtOH(S)1000	11,20±0,465	30,67± 0,522	33,58±0,614	39,12±0,403	41,81± 0,415	34,81± 0,416	20,68±0,395	13,69±0,472
EtOH(S)1000+Paracétamol+codéine100	11,55±0,070	32,78± 0,830	35,50± 0,495	40,5± 0,421	43,67± 0,594	38,42± 0,516	26,36± 0,296	15,56±0,329

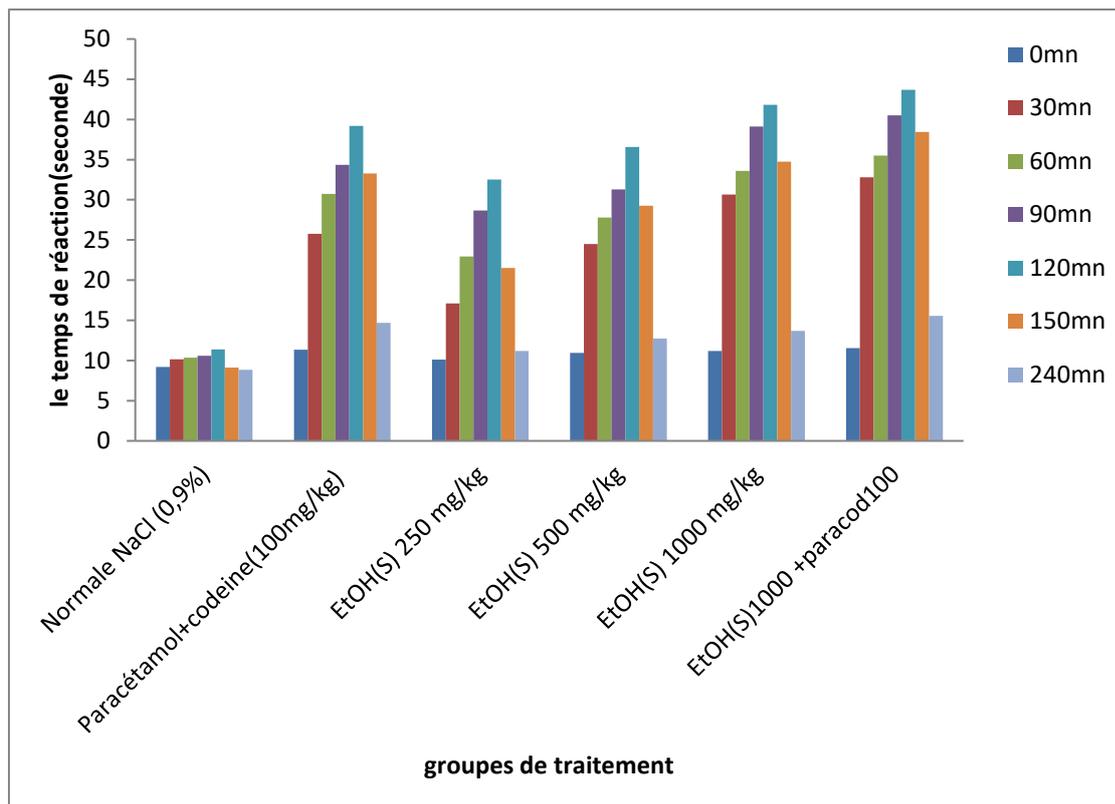


Figure. 36 : l'effet de l'extrait éthanolique, le Paracétamol +codéine et leur combinaison sur les souris déterminé par la méthode de la plaque chauffante

III.10.4. Test de KOSTER (Analgésie périphérique)

Le groupe témoin ayant reçu de l'eau physiologique présente, après injection intrapéritonéale de l'acide acétique à 1%, une moyenne de contorsions de $31,25 \pm 0,854$ sur une durée de 20 minutes. L'administration par gavage de diclofenac à la dose de 100 mg/kg l'apparition de contorsions ($8,5 \pm 0,645$) (Tab.29, Fig. 37 et Fig.38).

L'administration de l'extrait hydro-alcoolique prévient de façon dose dépendante, l'apparition de contorsions chez les souris. Avec 1000 mg/kg de l'extrait hydro-alcoolique, les crampes abdominales observées sont significativement différentes de celles observées avec le groupe témoin ($1,25 \pm 0,750$).

L'extrait hydro-alcoolique à 1000 mg/kg combiné avec le diclofenac 100mg/kg inhibe l'effet de l'acide acétique avec une moyenne de 0,50

A partir de 250mg/kg de l'extrait étudié administré par voie orale, le pourcentage de protection contre les crampes abdominales augmente d'une manière progressive et atteint son maximum à la dose 1000mg/kg.

Ces résultats sont différents de celles trouvés par Hwisa et al. (2011) sur l'extrait éthanolique d'*Helichrysum stoechas* par macération, ils ont montré que le nombre des crampes abdominales induites par l'acide acétique sous l'effet de 800mg/kg est de $23,0 \pm 10,54$ (47,78%) et que ce dernier augmente au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente et qui est inversement proportionnel à la dose.

Tableau.31 : Influence de l'extrait éthanolique et diclofenac et leur combinaison sur le nombre de crampes abdominales induites par l'acide acétique chez les souris (Test de Koster).

Animal	Dose	Nombre de crampes abdominales par souris				Nombre de crampes (Moyenne \pm SEM)	% Inhibition
Group	mg/kg	S1	S2	S3	S4		
Normale	10mL/kg	32	29	33	31	31,25 \pm 0,854	-
Diclorofenac	100	07	09	08	10	8,5 \pm 0,645	72,80
EtOH(S)	250	06	08	07	06	6,75 \pm 0,479	78,40
EtOH(S)	500	05	06	04	03	4,5 \pm 0,645	85,60
EtOH(S)	1000	0	3	0	2	1,25 \pm 0,750	96
EtOH(S) +Diclorofenac	1000+100	0	1	0	1	0,5 \pm 0,289	98,40

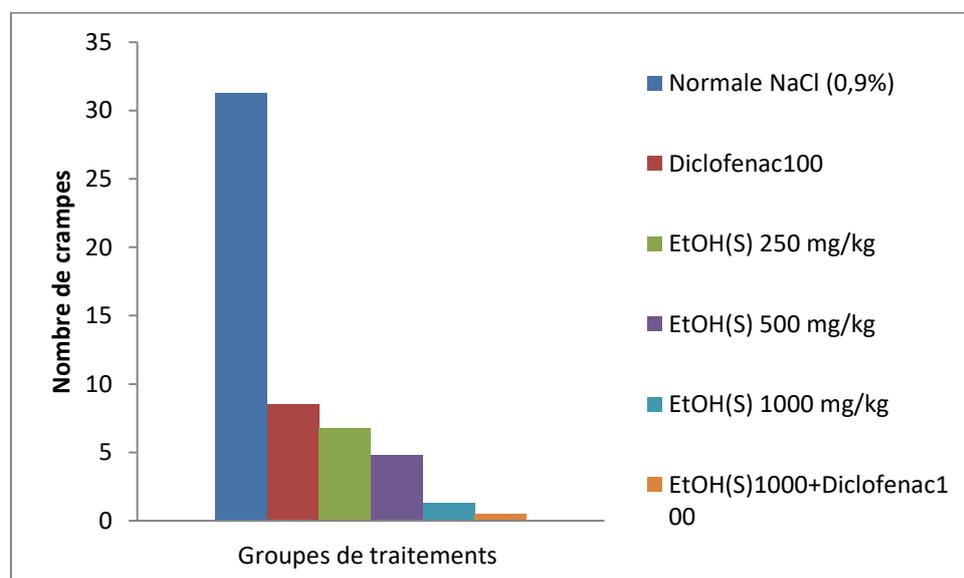


Figure.37 : Action analgésique périphérique de l'extrait éthanolique et diclofenac et leur combinaison administrée par voie orale chez les souris.

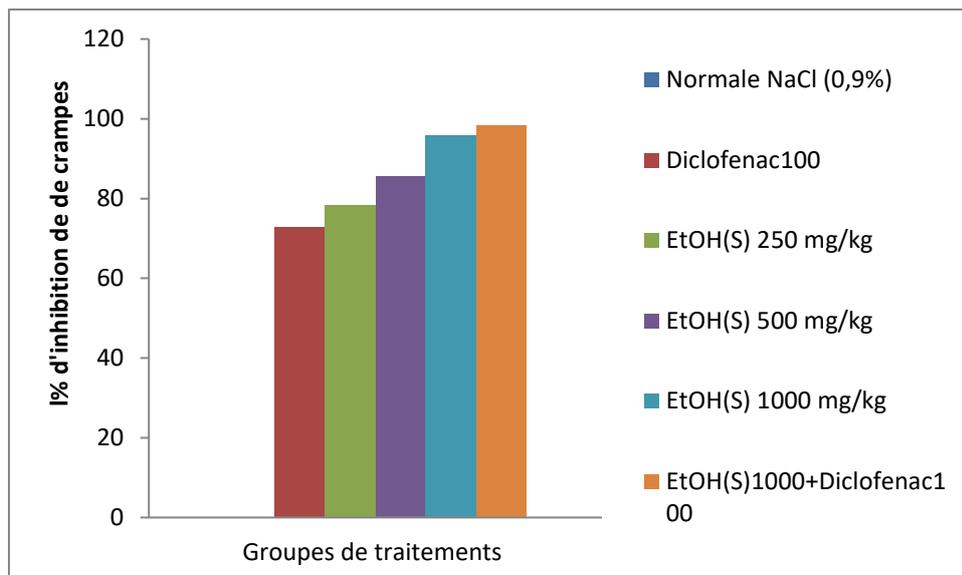


Figure.38 : Pourcentage de protection de l'extrait éthanolique et le diclofenac et leur combinaison sur les crampes induites par l'acide acétique chez les souris.

Des études ont démontré que l'acide acétique induit la libération de médiateurs endogènes de la douleur (comme la prostaglandine, kinine, histamine) qui stimulent les neurones nociceptifs sensibles aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (Sulaiman *et al.*, 2008).

Dans la présente étude, les doses de l'extrait alcoolique de *Helichrysum stoechas* ont significativement augmenté le temps de réaction dans la méthode d'immersion de la queue et la plaque chauffante, déduisant son activité analgésique à médiation centrale, car il exerce un effet protecteur significatif contre les stimuli de douleur thermique qui sont caractéristiques des médicaments analgésiques à action centrale tels que la morphine et la codéine. On réduisant le nombre de spasmes induits par l'acide acétique, on peut suggérer son activité analgésique périphérique

Au cours des réactions inflammatoires, l'activation des phospholipase A2 induit la mobilisation des acides gras, en particulier l'acide arachidonique de la membrane lipidique. L'acide arachidonique est ensuite oxydé par l'enzyme cyclo-oxygénase-1 (COX-1) constitutive ou l'enzyme cyclo-oxygénase -2 (COX-2) inductible, conduisant à la production de prostaglandines médiateurs de l'inflammation, impliqués dans de nombreuses affections liées la douleur.

Le mécanisme de l'activité anti inflammatoire et de l'activité analgésique pourrait être basé sur l'inhibition des cyclo-oxygénases et/ou lipo-oxygénases et la production des deux prostanoides (PGE2 et PGE2 α) et médiateurs inflammatoires (Tripathi, 2013)

Recio *et al.* (1991) ont isolé de l'extrait dichlorométhane de la partie aérienne de *H.stoechas* trois composés identifiés sous forme de 4-hydroxy-3- (isopenten-2-yl) -acétophénone, gnaphaliin (5,7-dihydroxy-3,8-diméthoxyflavone), et l'acide ursolique (acide 3β-hydroxyurs-12-ène-28-oïque).

Les trois composés ont montré une activité anti-inflammatoire comparée à l'Indométhacine et déterminée par le test d'œdème de l'oreille de souris induit par 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA). L'acide ursolique inhibe l'activité de l'élastase dans les leucocytes humains et la libération d'histamine; c'est aussi un inhibiteur sélectif de la cyclo-oxygénase-2.

Les compositions chimiques *Helichrysum stoechas* et *Helichrysum italicum* sont qualitativement les mêmes (Sala *et al.*, 2001 ; Kothavade *et al.*, 2013).

Silva *et al.* (2017) ont isolé l'arzanol de la partie aérienne d' *Helichrysum stoechas*, ce même composé est isolé d' *Helichrysum italicum* et déterminé comme anti-inflammatoire et anticytotoxique (Rosa *et al.*, 2007 ; Bauer *et al.*, 2011).

Sala *et al.* (2002) ont étudié l'activité anti-inflammatoire de différents extraits d'*Helichrysum italicum* (l'extrait méthanolique et éthanolique, butanolique, l'extrait d'acétate d'éthyl, d'hexane et dichlorométhane). Ils ont montré par plusieurs modèles d'inflammation que l'extrait le plus actif était l'extrait de dichlorométhane dans le test de TPA, l'extrait d'acétate d'éthyle dans les tests EPP (Ethyl PhenylPropiolate) et sérotonine et l'extrait butanolique dans les tests TPA et PLA₂ (Phospholipase A₂). Tous ces extraits réduisent la formation de l'œdème et ce ci grâce à leurs diversité en composition chimique telle que la présence de l'acide ursolique et 4 «-hydroxy-3 » - (3-méthyl-2-butényl) acétophénone qui sont aussi isolée à partir de *H.stoechas* et testé par Recio *et al.* 1991 dans le test TPA.

En 2003b les mêmes auteurs (Sala *et al*) ont isolés à partir de *Helichrysum italicum* six acétophénones, leur étude sur l'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique a démontré que 4-hydroxy-3- (3-méthyl-2-butényl) acétophénone est un inhibiteur de la cyclo-oxygénase et de la 5-lipoxygénase.

Dans la réduction de l'œdème de la patte de souris induit par la phospholipase A₂, le gamma-pyrone a inhibé la formation d'œdème. Les acétophénones étaient efficaces dans le test au carraghénane, 4-hydroxy-3- (3-méthyl-2-butényl) acétophénone ont donné les meilleurs effets analgésiques dans le test de convulsion de l'acide acétique. Le flavonoïde gnaphaliine isolés de l'extrait méthanolique de *H. italicum* était capable d'inhiber la production de leucotriène B₄, même résultat a été également obtenu par Recio *et al.*, (1991) sur *H.stoechas*.

A partir de ses données on peut suggérer que les effets analgésique et anti-inflammatoire sont dues principalement à la présence de l'acide ursolique et 4 «-hydroxy-3« - (3-méthyl-2-butényl) acétophénone

Les plantes appartenant à la famille des Asteraceae sont connues par leur pouvoir antalgique périphérique et central. Selon Kupuli *et al.* (2006) les trois *Helichrysum* étudiées (*Helichrysum arenarium* subsp *aucheri*, *Helichrysum pilicatum* subsp *pilicatum* et *Helichrysum noeanum*) ont un pouvoir anti-inflammatoire et antalgique grâce à leurs richesses en flavonoïdes

L'étude effectuée par Karaca *et al.* (2009) sur *Helichrysum plicatum* DC et *Tanacetum balsamita* a montré que les deux plantes ont une activité anti-inflammatoire et que la réduction de l'œdème a été attribuée aux flavonoïdes inhibiteurs de l'oxyde nitrique synthase et l'enzyme cyclo-oxygénase-2 (COX-2), parmi ces flavonoïdes, gnaphaliin, pinosembrin tiliroside. Ce dernier a été isolé à partir d'*Helichrysum italicum*, étudié pour leur propriété antioxydante et anti-inflammatoire par Sala *et al.*, 2003a, ils ont constatés qu'*in vivo*, le tiliroside a significativement inhibé l'œdème de la patte de la souris induit par la phospholipase A2 et l'inflammation de l'oreille de la souris induite par le TPA, réduit l'infiltration de l'œdème et des leucocytes induite par le TPA. Comme dans le cas des autres flavonoïdes, l'activité anti-inflammatoire du tiliroside pourrait être basée sur ses propriétés antioxydantes, bien que d'autres mécanismes soient probablement impliqués.

Conclusion

Afin d'isoler de nouvelles substances naturelles permettant de mettre au point de nouvelles voies d'application tant dans les domaines de la pharmacie, du cosmétique que de l'agro-alimentaire, le présent travail a permis de mettre en évidence la richesse d'*Helichrysum stoechas* en composés polyphénoliques, notamment en flavonoïdes et en tanin. Ces composés ayant des propriétés antimicrobiennes connues, leur présence pourrait donc expliquer les propriétés antibactériennes et antifongiques observées. Par ailleurs, il apparaît que cette plante détient un potentiel anti-radicalaire et antioxydant significatif.

A la limite de nos connaissances, il s'agit de la première étude sur l'activité antidiabétique *in vitro* des extraits aqueux de *H. stoechas*. Il a été trouvé que cette plante possède un effet inhibiteur puissant sur l' α -amylase et la glycosylation non enzymatique de l'hémoglobine. D'autre part, ces extraits ont facilité l'absorption de glucose par les levures. L'action antidiabétique peut être attribuée à la présence de composés phénoliques de différentes structures. Une étude expérimentale sur des modèles animaux a confirmé l'activité hypoglycémiante de la partie aérienne de cette plante.

Il ressort aussi de ce travail que la plante d'*H. stoechas* possède une très bonne propriété de stabilisation membranaire des érythrocytes et un effet marqué contre la dénaturation des albumines.

Il est bien établi que les prostaglandines et la bradykinine jouent un rôle important dans le processus de la douleur par conséquent, il est probable que les extraits de la plante contenant des polyphénols, des stéroïdes, des flavonoïdes et les tanins déterminées par dépistage phytochimique préliminaire pourraient inhiber la formation de ces substances. Considérant que la production de métabolites de l'acide arachidonique est le principal facteur responsable de la première et de la seconde phase de la réponse inflammatoire, nos résultats suggèrent que l'effet anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique d'*H. stoechas* pourrait être lié à l'inhibition de la libération ou de la synthèse des produits de la cyclo-oxygénase. Dans la présente étude, l'extrait éthanolique d'*H. stoechas* a significativement augmenté le temps de réaction dans la méthode d'immersion de la queue, de la plaque chauffante et réduisant le nombre de spasmes induits par l'acide acétique et inhibant l'œdème suggérant son activité analgésique et anti-inflammatoire. Ces résultats justifient certains usages ethno-pharmacologiques. D'autres études sur cette plante seront nécessaires telle que : l'histologie de pancréas des souris diabétiques induites par l'alloxane. De plus, l'utilisation d'autres types d'extraits organiques

révélerait des classes de métabolites secondaires organiques différents qui pourraient être responsables d'activités biologiques.



Références bibliographiques

Abbasi MA, Saleem H, Rehman A, Riaz T & Ajaib M. (2013). Determination of Antioxidant Activity and Phytoconstituent Screening of *Euphorbia heterophylla* Linn. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 3(2): 202-216.

Abirami. N, Natarajan B. & Sagadevan E. (2014). Phytochemical investigation and in vitro evaluation of hypoglycemic potential of *Grewia hirsute*. *Int J Pharm Bio Sci.*, 5(1): 76-83.

Aburjai T, Hudaib M, Tayyema R, Yousef M. & Qishawi M. (2007). Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Ajloun Heights region. *Journal of Ethnopharmacology*, 110 (2): 294-304.

Adisakwattana S(2017). Cinnamic Acid and Its Derivatives: Mechanisms for Prevention and Management of Diabetes and Its Complications. *Review Nutrients*, 9(163): 1-27.

Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme* 74 (7): 636-643

Ahuir AP, Estreder SM, and M Proft. (2017). Pro-and Antioxidant Functions of the Peroxisome-Mitochondria Connection and Its Impact on Aging and Disease. Review Article *Hindawi.Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 9860841, 17 pages <https://doi.org/10.1155/2017/9860841>.

Aiyegoro OA. & Okoh AI. (2010). Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1): 10-21.

Akkarachiyasit S, Yibchok-Anun S, Wacharasindhu S and Adisakwattana S. (2011). *In Vitro* Inhibitory Effects of Cyandin-3-rutinoside on Pancreatic α -Amylase and Its Combined Effect with Acarbose. *Molecules*, 16, 2075-2083; doi:10.3390/molecules16032075.

Al-awar A, Kupai K, Veszeka M, SzücsG, Attieh Z, Murlasits Z, Török S, Pósa A. &Varga C. (2016). Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *Review Journal of Diabetes Research*. Article ID 9051426, 12 pages.<http://dx.doi.org/10.1155/2016/9051426>.

Albayrak S, Sagdic O, Aksoy A, Hamzaoglu E. (2008). Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Helichrysum* Species from the Mediterranean Region of Turkey. *Asian Journal of Chemistry* 20 (4) : 3143-3152.

Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, Hamzaoglu E (2010a). Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected fromTurkey. *Food Chem.*, 119 : 114–122.

Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, Umit Budak. (2010b). Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of *Helichrysum* species collected from eastern Anatolia, Turkey. *Turk J Biol.*, 34 : 463-473.

Albayrak S., Aksoy A., and Sagdic O. (2013). In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. *Iranian Journal of Science & Technology*, A1: 1-9

Aliyu A.B., Ibrahim M.A., Ibrahim H., Musa A.M., Lawal A.Y., Oshanimi J.A., Usman M., Abdulkadir I.E., Oyewale A.O. and Amupitan J.O. (2012). Free radical scavenging and total antioxidant capacity of methanol extract of *Ethulia conyzoides* growing in Nigeria. *Romanian Biotechnological Letters*, 17, pp7458-7465.

Al-Jubory S.Y. (2013). Lethal Dose (LD₅₀) and acute toxicity, histopathological effects of glycosides extract of *Lawsonia inermis* (Henna) leaves In mice. *Journal of Babylon University Pure and Applied Sciences*, (21): 1093-1101.

Alli LA, Nafiu MO, Adesokan AA, Akanji MA, Tijani AY, Salawu OA. (2014). Antipyretic and analgesic activities of aqueous extract of *Acacia nilotica* root *Biokemistri*, 26 (2) 55–62 30.

Al-Salmi AA, Sattar MAAA, Khan LM, & Al-Harathi SE. (2015). Comparative study of analgesic and anti-inflammatory effects of *Commiphora opobalsamum* with diclofenac in rodents. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9(32): 806-817.

Alvarez MR, Bueno PR, Cruz RO, Macapulay R, Vallesfin FJ, & Heralde III F. (2016). Phytochemical analysis and salivary amylase inhibition activities of *Carica papaya* leaf and *Garcinia mangostana* pericarp extracts and partially purified fractions. *Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res.* 6(1):34-40.

Akinwunmi KF, Oluwafemi AV & Oyedapo OO. (2015). Evaluation of antioxidant capacity and membrane stabilizing potential of stem and root of *Cyphospenna adenocaulis* (Steud). *Afr. J. Biotechnol.* Vol 14, Issue 21, pp. 1820-1827

Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddamc P, Barld B & Weile JA. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84: 551–562.

Amirah DMRP & Maksudur R K. (2012). Comparison of extraction techniques on extraction of Gallic acid from stem bark of *Jathropha curcas*. *J. Applied Sci.*, 12(11): 1106-1111.

Anyasor GN, Onajobi F, Osilesi O, Adebawo O, Oboutor EM. (2015). Evaluation of *Costus afer* Ker Gawl. *in vitro* anti-inflammatory activity and its chemical constituents identified using gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Coastal Life Medicine*, 3(2):132-138.

Ascensão L, Da Silva JAT, Barroso JG, Figueiredo AC & Pedro LG. (2001). Glandular trichomes and essential oils of *Helichrysum stoechas*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 49:115–122.

Asgary S, Naderi GHA, Attar AM, Sajjadian A, Kafil F, Fatehi Z. (2006). Inhibitory effects of *crataegus curvisepala*, *salvia hydrangea*, and *betula pendula* on in-vitro protein glycosylation. *ARYA Journal*, 1(4): 238-241.

Ashley N T, Weil Z M, Nelson R J.(2012). Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*,43:385–406.

Ashok KP. and Upadhyaya K. (2013). Evaluation of Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Aerial Parts of *Artemisia vulgaris* L. in Experimental Animal Models. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 3(1): 101-105.

Ashok KP and Upadhyaya K. (2012). Tannins are astringent. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. Volume 1 Issue 3, pp 45-50

Ashok KBS, Lakshman K, Jayaveera KN, Sheshadri Shekar D, Narayan Swamy VB, Saleemulla Khan, Velumurga C. (2011). *In Vitro* α -Amylase Inhibition and Antioxidant Activities of Methanolic Extract of *Amaranthus caudatus* Linn. *Oman Medical Journal*. Vol. 26, No. 3: 166-170.

Aslan M, Özçelik B, Orhan I, Karaoglu T and Sezik E.(2006). Screening of antibacterial, antifungal and antiviral properties of the selected Turkish *Helichrysum* species. *Planta Med.*, 72: 997-997.

Aslan M, Orhan DD, Orhan N, Sezik E, Yesilada E. (2007a). In vivo antidiabetic and antioxidant potential of *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* capitulums in streptozotocin-induced-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* , 109: 54–59.

Aslan M, Orhan DD, Orhan N, Sezik E, and Yesilada E. (2007b). A Study of Antidiabetic and Antioxidant Effects of *Helichrysum graveolens* Capitulums in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Med Food* , 10 (2): 396–400.

Auberval N. (2010). Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par les antioxydants d'origine naturelle. Thèse de doctorat en sciences. Université de Strasbourg. 258p.

Barroso M, Barros L, Duenas M, Carvalho AM, Santos-Buelg C, Fernandes IP, Barreiro MF, Ferreira ICFR. (2014). Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into amoisturizer. *Industrial Crops and Products*, 53 : 330– 336.

Bastiaens H, Benhalima K, Cloetens H, Feyen L, Nobels F, Koeck P, Sunaert P, Van Crombrugge P, Van PottelberghI, van Leeuwen E, Verhaegen A. (2013). Diabète sucré de type 2. « Recommandations de Bonne Pratique » (RBP) de la SSMG Sixth edition Avec la collaboration de : Ineke Meul et Johan Wens, p.1-122.

Batiston WP, Maruyama S A, Gomes STM, Visentainer J V, Souza N E d and Matsushita M. (2013). Total phenolic content and antioxidant capacity of methanolic extracts of ten fruits. *Acta Scientiarum Technology*, 35 (3): 581-585.

Baud. Olivier and Gressens. Pierre. (2009). Voie de signalisation Sonic Hedgehog et impact des glucocorticoïdes sur le cerveau en développement. *MEDECINE/SCIENCES n° 8-9, vol. 25: 713-717.*

Bauer J, Koeberle A, Dehm F, Pollastro F, Appendino G, Northoff H, Rossi A, Sautebin L, Werz O. (2010). Arzanol; a prenylated heterodimeric phlorogluciny pyrone; inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy. *Biochemical Pharmacology*, 81 (2):1-45.

Beaudeau JL, Geneviève D. (2011). *Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives* 2^{ème} Éd, LAVOISIER, p128 (608p)

Békro YA, Békro JAM, Boua BB, FH. TraBi & Éhilé EE. (2007). Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences et Nature*, 4 (2) : 217 – 225.

Benhadou Andaloussi A. (2009). Etude des propriétés antidiabétiques de *Nigella sativa*: sites d'action cellulaires et moléculaires. Thèse de Doctorat en pharmacologie. Université Montréal.

Ben Sghaier M, Louhichi T, Hakem A, Ammari Y. (2018). Chemical investigation of polar extracts from *Ruta chalapensis* L. growing in Tunisia: Correlation with their antioxidant activities. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 49(4): 2971-2978.

Bhat M, Zinjarde SS., Bhargav SY., Ravi AK and Joshi B N. (2011). Antidiabetic Indian Plants: A Good Source of Potent Amylase Inhibitors. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 810207, 6 pages.

Birru E M, Abdelwuhab M & Shewamene Z. (2015). Effect of hydroalcoholic leaves extract of *Indigofera spicata* Forssk on blood glucose level of normal, glucose loaded and diabetic rodents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15: 321-8.

Bnouham M. Mekhfi H. Legssyer A. & Ziyat A. (2002). Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Journal of Ethnopharmacology Forum*, 10: 33-50.

Bogdadi H.A.A, Kokoska L, Havlik J, Kloucek P, Rada V and Vorisek K. (2007). *In Vitro* antimicrobial Activity of Some Libyan Medicinal Plant Extracts. *Pharmaceutical Biology*, 45 (5): 386-391.

Bonnetblanc J M, Chosidow O, Grosshans E. (2002). Prescription et surveillance des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. *Ann Dermatol Venereol*, 12 (2) :157-161

Bouزيد D. et Zerroug M.M. (2016). Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. D on essential oil. *Der Pharmacia Lettre*, 8 (4): 41-44.

Buzayan MM and El-Garbull .FR. (2012). Antibacterial Activity of Medicinal Aqueous Plant Extracts against *Mycobacterium tuberculosis*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(3): 203-206.

Carini M., Aldini G, Furlanetto S, Rita Stefani & Roberto Maffei Facino. (2001). LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24:517–526.

Carreon J R, Tomintz K, and Llanos N.L. (2013). The effects of *lagerstroemia speciosa* crude tea extracts on the kinetics of porcine pancreatic alpha-amylase. Research Congress FNH-I-007

Celikel N and Kavas G. (2008). Antimicrobial Properties of Some Essential Oils against Some Pathogenic Microorganisms. *Czech J. Food Sci.* 26 (3) :74-81.

Chaouche T.M, Haddouchi F, Zerhouni K et Sidi-yekhelef A. (2016). Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*. *Afrique Science*, 12(3): 144 – 150.

Chatterjee A, Sen B, Das S, Chatterjee T K. (2015). Anti-inflammatory and Analgesic Activity of Methanolic Extract of Medicinal Plant *Rhodiola rosea* l. Rhizomes. *International Journal of Pharma Research & Review*, 4(2):1-8.

Chavan UD, Shahidi F and Nacz M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *J. Food Chem*, 75 (4) : 509-512.

Chen, A.Y., Chen, Y.C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry* 138, 2099-2107.

Chiolero A, Würzner G, Burnier M. (2000). Les inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase de type 2: moins d'effets rénaux que les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques? . *Néphrologie* ,21(8) : 425-430

Chinedu E., Arome D. & Ameh FS. (2013). A New Method for Determining Acute Toxicity in Animal Models. *Toxicology International*, 20 (3):224-226.

Chirumbolo S. (2010). The Role of Quercetin, Flavonols and Flavones in Modulating Inflammatory Cell Function Inflammation and Allergy - Drug Targets, Vol. 9, No. 3: 1-23

Coulibaly B, N'guessan KR, Aka N, Ekaza E, N'golo DC, Trébissou N, Ouattara L, Bahi C , Coulibaly A , Assandé JM , Mohui P, Yao H , Djaman AJ & Dosso M. (2011). Activité antimycobactérienne *in vitro* des extraits de *Phyllanthus amarus* (Schum et Thonn) sur les souches de *Mycobacterium ulcerans* en Côte d'Ivoire. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 80 : 759-771.

Coura CO, Souza RB, Rodrigues JAG, Vanderlei EdSO, de Araújo IWF, Ribeiro NA, Frota A F, Ribeiro KA, Chaves HV, Pereira KMA, da Cunha RMS, Bezerra MM, Benevides NMB. (2015). Mechanisms Involved in the Anti- Inflammatory Action of a Polysulfated Fraction from *Gracilaria cornea* in Rats. PLOS ONE. DOI:10.1371/Journal.pone.0119319, pp 1-18.

Daksha G, ChandraShekar KS, Pai G. (2013). *In vitro* antidiabetic activity of pentacyclic triterpenoids and fatty acid esters from *Bauhinia purpurea*. *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Technology*, 2(1): 25-28.

Dellile A.L. (2008). Les plantes médicinales d'Algérie. Edition Berti. Alger, p.214

Dilika F, Bremmer P.D., Meyer J.J.M. (2000). Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites. *Fitorapia* 71, 450-452.

Dinesha R, Mohamed Azmathulla Khan Y, Subhas Chandrappa M, Santosh Kumar N, Harsha R K, Chikkanna D. (2015). *In vitro* anti-diabetic activity of *Muntingia calabura* root proteins. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (10): 1526-1534.

Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 22 : 296 - 302

Drouin. P, Blickle J.F, Charbonnel B, Eschwege E, Guillausseau P.J, Plouin P.F, Daninos J.M, Balarac N, Sauvanet J.P. (1999). Diagnostic et classification du diabete sucré les nouveaux criteres. *Diabetes & Metabolism (Paris)*, 25, 72-83.

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

El Hajaji H., Lachkar N, Alaoui K., Cherrah Y., Farah A., Ennabili A., El Bali B. & Lachkar M. (2011). Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of *Carob* tree barks growing in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*, 4: 321–324.

Eroğlu H.E, Aksoy A, Hamzaoğlu E, Budak Ü & Albayrak S. (2009). Cytogenetic effects of nine *Helichrysum* taxa in human lymphocytes culture. *Cytotechnology*, 59:65–72.

Faozia A.I, Ateea A.B and Abubaker M.H. (2017). Screening of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Native Plants in El-Jabal El-Akhdar Province – Libya. *Ijsrm. Human*. 5 (4): 79-94.

Favier A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr*, 64(6): 390-396.

Favier A. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité chimique*, 12: 108-115.

Ferosekhan M., Ramu A. and Ravikumar S. (2016). Scientific evaluation of traditionally known insulin plant *Costus* species for the treatment of diabetes in human. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 3(6): 87-91.

Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut il devenir toxique ? Mécanismes biochimiques. *L'actualité chimique* : 91-96.

Galbany-Casals M, Saez .L and Benedi C. (2006). A taxonomic revision of *Helichrysum* sect.*Stoechadina* (Asteraceae, Gnaphalieae). *Can. J. Bot.* 84: 1203–1232

Ghasemi K, Ghasemi Y and zadeh M A E. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22(3): 277-281.

Gillett.M J. (2009). International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes. *Clin Biochem Rev*; 30(7): 197-199.

Giovannini A, Mascarello C, Pipino L, Nostro A. (2008). Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation in Mediterranean *Helichrysum*. *Transgenic Plant Journal*, 2(1): 54-61.

Goldenberg R and Punthakee Z. (2013). Canadian Diabetes Association. Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada: Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. *Canadian Journal of Diabetes*, 37, S8-S11.

González-Gallego J, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr. Hosp.* 22: 287-293.

Gouveia-Figueira SC, Gouveia CA, Carvalho M J, Rodrigues A I, Nording M L & Castilho P C. (2014). Antioxidant Capacity, Cytotoxicity and Antimycobacterial Activity of Madeira Archipelago Endemic *Helichrysum* Dietary and Medicinal Plants. *Antioxidants*, 3: 713-729.

Gouveia NM., Albuquerque CL., Espindola LS. and Espindola FS.. (2013). *Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences.* 85(3): 1141-1148.

Gouveia S & Castilho PC. (2011). Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by RD-HPLC-DAD-(-)-ESI MSⁿ method. *Food Chemistry* 129, 333-344.

Guimarães R, Barros L, Dueñas M, Calhella RC, Carvalho AM, Santos-Buelga C, Queiroz MJ, Ferreira IC. (2013). Infusion and decoction of wild German chamomile: bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 136(2):947-954 DOI 10.1016/j.foodchem.2012.09.007

Guinoiseau E, Lorenzi V, Luciani A, Muselli A, Costa J, Casanova J and Berti L. (2013). Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.) FORMATEX; 1073-1080

Gul-E-R, Karim S, Khurhsid R, Saeed-UL-Hassan S, Tariq I, Sultana M, Rashid A J, Shah SH and Murtaza G. (2013). Hypoglycemic activity of *ficus racemosa* bark in combination with oral hypoglycemic drug in diabetic human. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 70(6), pp. 1045- 1049

Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M, Aboul-Enein HY. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry* , 3:43–53.

Habtemariam S. (2017). Protective effects of caffeic acid and the alzheimer's brain: an update. *Mini Rev. Med. Chem.* 17(8):667-674. doi: 10.2174/1389557516666161130100947.

Haddouchi F, Zerhouni K, Sidi-yekhelef A et Chaouche T M. (2016). Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 85, p. 152 – 159.*

Haddouchi F, Chaouche TM, Ksouri R, Medini F, Sekkal FZ, Benmansour A. (2014). Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum stoechas* subsp.*rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *Saxatile*. *Chinese Journal of Natural Medicines* 12(6): 0415- 422.

Haddouchi F, Chaouche TM, Benmansour A, Sakkal FZ, Atik-Bekkara F. (2012). Preliminary phytochemical screening of *Helichrysum stoechas ssp rupestre* of west Algerian. *Indo-Global Research Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(4): 1-9.

Haleng J, Pincemail J, Defraigne J.O, Charlier C, Chapelle .J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*; 62 : 10 : 628-638.

Hassan M, Niazi AT, Khan S & Gul F. (2018). Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of *Artemisia absinthium* L., *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. and *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br. ex Sm. on type II diabetes hyperlipidemic patients. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 17 (2) : 233-239.

Heilerová L., Bučková M., Tarapčík P, Šilhár S, Labuda J. (2003). Comparison of antioxidative activity Data for aqueous extracts of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), Oregano (*Origanum vulgare* L.), Thyme (*Thymus vulgaris* L.), and Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) obtained by Conventional Methods and the DNA-Based Biosensor. *Czech J. Food Sci.* 21 (2) : 78–84.

Hendra R., Ahmad S., Oskoueian E. & Suk. MY. (2011). Antioxidant, Anti-inflammatory and Cytotoxicity of *Phaleria macrocarpa* (Boerl.) Scheff Fruit. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11: 100-110.

Hengameh P, Rajkumar HG. (2016). Evaluation of Some Lichen Extracts for β -Glucosidase Inhibitory as a Possible Source of Herbal Anti-diabetic Drugs. *American Journal of Biochemistry*, 6(2): 46-50.

Hossain M.M, M S H Kabir, A Hasanat, Md. I Kabir, T A Chowdhury, A S Md. GolamKibria. (2015). Investigation of *in vitro* anti-arthritis and membrane stabilizing activity of ethanol extracts of three Bangladeshi plants. *The Pharma Innovation Journal*, 14(1): 76-80.

Hostettmann K and Wolfender JL (2001). Applications of liquid chromatography/UV/MS and liquid chromatography/NMR for the online identification of plant metabolites. In: Tringali C (ed) *Bioactive compounds from natural products-isolation, characterisation and biological properties*. Taylor and Francis, London, pp 31–68.

Hwisa N, Auzi A, Parvez N, Molvi K, Sherif F. (2011). Antinociceptive effect of *Helichrysum stoechas* in experimental animals. *IJPI's Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1(2).

Issa IA & Bule MH. (2015). Hypoglycemic Effect of Aqueous and Methanolic Extract of *Artemisia afra* on Alloxan Induced Diabetic Swiss Albino Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2015, Article ID 752486, 5 pages.

Iwueke A.V, Nwodo O. F. C. & Okoli, C.O. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activities of *Vitex doniana* leaves. *African Journal of Biotechnology*, 5 (20):1929-1935.

Jabir K.V., B. Jayalakshmi and Hashim K.M. (2014). *In-vitro* anti diabetic studies and phytochemical evaluation of *Heracleum candolleianum*. *al Asian J. Plant Sci. Res.* 4(4):31-36.

Jalili A., Heydari R., Sadeghzade A., Alipour S. (2012). Reducing power and radical scavenging activities of phenolic extracts from *Juglans regia* hulls and shells. *African Journal of Biotechnology*, 11(37):9040-9047.

Jami SI, Sultana Z, Ali M, Begum M, Haque M. (2014). Evaluation of Analgesic and Anti-Inflammatory Activities on Ethanolic Extract of *Terminalia chebula* Fruits in Experimental Animal Models Md. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 63-69.

Jayaprakasam R. & Ravi T.K. (2012). Evaluation of anti arthritic activity of the root extract of *Acalypha indica* linn. Using *in vitro* techniques. *IJPP*, 2(6):169-173.

Jijith U.S. and Jayakumari S. (2017). Recent advances and methods for *in vitro* evaluation of antidiabetic activity: A review. *Int. J. Res. Ayurveda. Pharm.* 8(1): 81-87.

Joshi B, Sah GP, Basnet B, Bhatt MR, Sharma D, Subedi K, Pandey J & Malla R. (2011). Phytochemical extraction and antimicrobial properties of different medicinal plants: *Ocimum sanctum* (Tulsi), *Eugenia caryophyllata* (Clove), *Achyranthes bidentata* (Datiwan) and *Azadirachta indica* (Neem). *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(1), pp. 1-7.

Kalpana P B, Keshav R P, Kushal S, Ananda B, Sumit Bahadur B C, Pravin P, Umesh Tand Shankar RD.(2015). Investigation of antioxidant and anti-inflammatory activity of roots of *Rumex nepalensis* World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 4(3), 582-594.

Karaca M, Ozbek H, Akkan H.A, Tutuncu M, Ozgokce F, Him A and Bakir B. (2009). Anti-Inflammatory Activities of Diethyl-Ether Extracts of *Helichrysum plicatum* DC. and *Tanacetum balsamita* L. in Rats. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4 (2): 320-325.

Karber G. (1931). Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 162: 480-483. Cited by Turner, R. (1965): Screening methods in pharmacology. Academic Press. New York and London. 63-64.

Kareem I, Jaweed SA, Bardapurkar JS, Patil VP. (2004). Study of magnesium, glycosylated hemoglobin and lipid profile in diabetic retinopathy *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 19 (2) 124-127.

Kasangana PB, Haddad PS & Stevanovic T. (2015). Study of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of *Myrianthus Arboreus* (Cecropiaceae) Root Bark Extracts. *Antioxidant*, 4: 410-426.

Kazeem M.I., Adamson J.O. & Ogunwande I. A. (2013). Modes of Inhibition of α -Amylase and α -Glucosidase by Aqueous Extract of *Morinda lucida* Benth Leaf. *BioMed Research International*. 1-6. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/527570>.

Kazempour S F, langehbiz S V, Hosseini M, Shafei M N, Ghorbani A, Pourganji M. (2015). The Analgesic Effects of Different Extracts of Aerial Parts of *Coriandrum Sativum* in Mice. *International journal of Biomedical science*, 11(1): 23-28.

Keffous F., Belboukhari N., Sekkoum K., Djeradi H., Cheriti A. and Aboul-Enein HY. (2016). Determination of the antioxidant activity of *Limoniastrum feei* aqueous extract by chemical and electrochemical methods. *Cogent Chemistry*, 2: 118-141.

Kim JS., Kwon CS., Son KH. (2000). Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci Biotechnol Biochem*. 64 (11): 2458-61.

Koffi OKA, Kadja AB., Sê Irie Bi N., Boussou SDP., Guessenn NK., Mamyrbékova-Békro JA. & Békro YA. (2018). Bio-guided phytochemical investigation of two medicinal plants from Côte d'Ivoire. *Academia Journal of Biotechnology*, 6(4): 090-099.

Kothavade PS., Nagmoti D M., Bulani V D., and Juvekar A R. (2013). Arzanol, a Potent mPGES-1 Inhibitor: Novel Anti-Inflammatory Agent. *Review. The ScientificWorld Journal*. Article ID 986429, 9 pages.

Kouadio NJ, Guessennd NK, Kone MW, Moussa B, Koffi YM, Guede KB, Yao K, Bakayoko A, Trabi HF & Dosso M. (2015). Evaluation de l'activité des feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geisel.) Müll.-Arg (Euphorbiaceae) sur des bactéries multirésistantes et criblage phytochimique. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 9(3): 1252-1262

Kouakou SL, Kouakou GS, Laba ID & Brou JK. (2010). Evaluation de l'activité analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *Mitracarpus scaber* Zucc (Rubiaceae), une plante médicinale de Côte d'Ivoire. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 4(2): 456-463.

Krimat S., Dob T., Lamari L., Boumeridja S., Chelghoum C., Metidji H. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(6): 478-483.

Kumar S, Sandhir R and Ojha S .(2014). Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of *Lantana camara* leaves. *BMC Research Notes* 7:560. <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/7/560>, pp 1-9.

Küpeli E, Tosun A, Bahadır Ö. (2006). Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Helichrysum GAERTNER* species (asteraceae). *Turk J Pharm Sci* 3(3):141-149.

Lalisa Wakjira Duresa. (2017). Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Selected Mango (*Mangifera indica* L.) and Avocado (*Persea Americana*) Fruits in Illu Ababor Zone, Oromia regional state, Ethiopia. *Journal of Applied Chemistry (IOSR-JAC)*,10(5): 24-28.

Lavault M. & Richomme P. (2004). Constituents of *Helichrysum stoechas* variety olonnense. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(2), pp. 118–121.

Lawal OA, Amisu KO., Akinyemi SK., Sanni AA., Simelane M.B.C., Mosa R.A. & Opoku AR. (2015). *In vitro* Antibacterial Activity of Aqueous Extracts of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) from Nigeria. *British Microbiology Research Journal* 8(4): 525-531.

Les F., Vendittib A., Cásedasa G., Frezzac C., Guisob M., Sciubbab F., Serafinic M., Biancob Ad., Valerod MS. & López V. (2017). Everlasting flower (*Helichrysum stoechas* Moench) as a potential source of bioactive molecules with antiproliferative, antioxidant, antidiabetic and neuroprotective properties. *Industrial Crops and Products*, 108: 295–302.

Lhuillier A. (2007). Thèse de doctorat. Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook F Ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker

(Ericaceae), Tambourissa trichophylla Baker (Monimiaceae) ET Embelia Concinna Baker (Myrsinaceae) N° d'ordre : 2467. L'Institut National Polytechnique de Toulouse.

Liu. R., Zhang H., Yuan M., Zhou J., Liu J-J & Wang J. (2013). Synthesis and biological evaluation of apigenin derivatives as antibacterial and antiproliferative agents. *Molecules* 18, 11496-11511.

Lourens A.C.U, Viljoen A.M. & Van Heerden F.R. (2008). South African *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 630–652.

Lourens A.C.U, Reddy D, Baser KHC, Viljoen A.M. & Van Vuuren S.F. (2004). Composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. *J. Ethnopharmacology*, 95(2-3): 253-258.

Madan S, Prashant S, Neeraj U and Yogesh S. (2011). *In vitro* Anti-arthritis Activity of *Manilka razapota* Linn. *Asian J. Pharm. Tech.* 1(4): 123-124.

Maheshwari D.G. & Shaikh Nusrat K. (2016). An overview on- toxicity testing methods. *International Journal of Pharmacy and Technology*, 8(2): 3834-3849.

Mahmood D.F, Abderrazak A, El Hadri K, Simmat T and Rouis M . (2013) . The Thioredoxine system as a Therapeutic Target in Human Health and Disease. *TIOXIDANTS Antioxid Redox Signal.* 19(11):1266-1303. doi: 10.1089/ars.2012.4757.

Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, 9 : 35- 40.

Maier A, Volker B, Boles E, Fuhrmann G F. (2002). Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (counter transport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters *FEMS Yeast Research*, 2(4):539-550.

Malathi L., Masthan K.M.K., Balachander N., Aravindha Babu N., Rajesh E. (2013). Estimation of Salivary Amylase in Diabetic Patients and Saliva as a Diagnostic Tool in Early Diabetic Patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 7(11): 2634-2636.

Manasa G.C, Meena Kumari.P, Nagesh M & Manohar N. (2015). Evaluation of the phytochemical, antiproliferative, antioxidant, antibacterial activities of *Kalanch blossfeldiana* leaves. *World Journal of Pharmaceutical Research* 4 (12) : 1201-1214.

Mastelic J, Politeo O, Jerkovic I, Radosecic N. (2005). Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chemistry of Natural Compounds*, 41(1), 35-40.

Michael UA, David BU, Theophine CO, Philip FU, Ogochukwu AM, Benson VA. (2010). Antidiabetic effect of combined aqueous leaf extract of *Vernonia amygdalina* and metformin in rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 1 (3): 197–202.

Mishra N.K, Bstia S., Mishra G., Chowdary K.A., Patra S.. (2011). Anti-arthritic activity of *Glycyrrhiza glabra*, *Boswellia serrata* and their synergistic activity in combined formulation studied in Freund's adjuvant induced arthritic rats. *J Pharm Educ Res*. 2(2):92-98.

Morales G and A Paredes. (2014). Antioxidant activities of *Lampaya medicinalis* extracts and their main chemical constituents. *Complementary and Alternative Medicine*, 14: 1-12.

<https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-259>.

Moreira MR., Ponce AC., del Valle CE., Rourab SI. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 38: 565–570.

Muanda F., Koné D., Dicko A., Soulimani R. & Younos C. (2009). Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of Three Malian Medicinal Plant Parts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 674320, 9 pages doi:10.1093/ecam/nep109.

Mukhopadhyay D, Rahman K A, Roy D & Dasgupta P. (2015). Evaluation of *In-vitro* Antioxidant Activity and Phytochemical Constituents of Kulekhara (*Hygrophilia spinosa*). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*; 7(5); 984-990

Mukhtar HM, Wadhan P, Singh V. (2013). Hypoglycaemic Activity of Flower Heads of *Artemisia maritima* in Normal and Alloxan-induced Diabetic Rats. *Journal of Natural Remedies*, 13 (1): 10-13.

Muruganandam S., Rajesh V., Dhamodharan R, Arumugam P, Ravikumar S. (2016). Antioxidant and Antidiabetic potentials of *Mussaenda tomentosa* Wight Ex Hook. F. *IJPPR*, 8 (1): 1-11.

Muster D., (2005). Médicaments de l'inflammation. *EMC-Stomatologie*, 1: 21–29.

Nair S.S. , Kavrekar V , Mishra A. (2013). Evaluation of In Vitro Anti diabetic Activity of Selected Plant Extracts *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* ISSN Volume 2 Issue 4 PP.12-19

Nanna RS, Banala M, Pamulaparthi A, Kurra A, Kagithoju S. (2013). Evaluation of Phytochemicals and Fluorescent Analysis of Seed and Leaf Extracts of *Cajanus cajan* L. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 22(1): 11-18.

Nanyonga SK., Opoku AR., Lewu FB. & Oyedeji AO. (2013). Variation in chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of fresh and dry leaves and dry stem of *Tarchonanthus camphorates*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(8): 442-447.

Narkhede M.B, Ajimire P.V, Wagh A.E, Mohan M and Shivashanmugam AT. (2011). *In vitro* antidiabetic activity of *Caesalpina digyna* (R.) methanol root extract. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1 (2): 101-106.

Nayaka, H.B., Londonkar R.L., Umesh M.K., Tukappa A. (2014). Antimicrobial attributes of apigenin, isolated from *Portulaca oleracea* L. *International Journal of Bacteriology*. Article ID 175851, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/175851>

Ncube N. S, Afolayan A. J. and Okoh A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (12), pp. 1797-1806.

Ndiaye M., SY Gy, Dièye AM, Touré MT, Faye B. (2006). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles *D'Annona reticulata* (Annonaceae) sur l'oedème aigu de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* XIV:179-186.

N'gaman Kohué Christelle Chantal, Békro Yves-Alain, Mamyrbékova-Békro Janat Akhanovna, Bénié Anoubilé et Gooré Bi Stéphane. (2009). Sur la Composition en Métabolites Secondaires et l'activité anti-oxydante d'extraits bruts de *Gmelina Arborea* Roxb. (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique de l'Ouest: Analyse par Chromatographie en Couche Mince. *European Journal of Scientific Research*, 36 (2): 161-171.

Nguelefack T. B, A. L. Fotio, P. Watcho, S. L. Wansi, T. Dimo and A. Kamanyi. (2004). Analgesic Properties of the Aqueous and Ethanol Extracts of the Leaves of *Kalanchoe crenata* (Crassulaceae). *Phytother. Res.* 18 : 385–388.

N'guessan K., Kadja B., N. Zirihi G., Traoré D. et Aké-assi L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences et Nature*, 6(1) : 1 – 15.

Niel.Marion. (2016). Traitement de l'acné par la phytothérapie et l'aromathérapie. Sciences pharmaceutiques. Thèse de Doctorat en pharmacie. UNIVERSITE DE BORDEAUX

Njagi J M, Ngugi M P, Kibiti C M, Ngeranwa J, Njue W, Gathumbi P, Njagi E. (2015). Hypoglycemic effect of *Helichrysum odoratissimum* in alloxan induced diabetic mice. *The Journal of Phytopharmacology*, 4(1): 30-33.

Njagi J M, Ngugi M P, Kibiti C M, Ngeranwa N J J, Njagi E N M, Mbiti W N, Maina D & Gathumbi P K. (2012). Evaluation of Antidiabetic Effects of *Kleinia Squarrosa* on Alloxanized Diabetic Mice . *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 2 (2).

Ogundele AV, Otun KO, Ajiboye A, Olanipekun BE, and Ibrahim RB. (2017). Anti-diabetic efficacy and phytochemical screening of methanolic leaf Extract of pawpaw (*Carica papaya*) grown in North Central Nigeria. *JOTCSA*. 4(1): 99-114.

Olga SZ, Tuchin VV, Meglinski I, Ritchie L. (2007). Near-infrared absorbance measurements of hemoglobin solutions incubated with glucose. *Proc. of SPIE* Vol. 6436, 64360S, <http://dx.doi.org/10.1117/12.711053>.

Omodamiro OD. and Amechi U. (2013). The phytochemical content, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Lycopersicon esculentum* (Tomato). *Asian Journal of Plant Science and Research*, 3(5):70-81.

Onaran M., Orhan N., Farahvash A., Ekin HN., Kocabıyık M., Gönül İ., Şen İ. and Aslan M. (2016). Successful treatment of sodium oxalate induced urolithiasis with *Helichrysum* flowers. *J. Ethnopharmacol.* 186: 322-328.

Orhan, N., Onaran, M., Şen, İ., Gönül İ. And Aslan, M. (2015). Preventive treatment of calcium oxalate crystal deposition with immortal flowers. *J. Ethnopharmacol.* 163, 60–67.

Orhan N., Hoşbaş S, Orhan DD, Aslan M., & Ergun F. (2014). Enzyme inhibitory and radical scavenging effects of some antidiabetic plants of Turkey. *Iran J Basic Med Sci*, Vol. 17, No. 6.

Ouédraogo N. Lompo M, Sawadogo R.W, Tibiri A, Hay A E, Koudou J, Dijoux MG., Guissou I.P. (2012). Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phytothérapie*, 10:286–292.

Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 44: 307-315.

Oyedapo O.O., Akinpelu B. A., Akinwunmi K. F., Adeyinka M. O. & Sipeolu F.O. (2010). Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *Int. J. Plant Physiol. Biochem.* 2(4), pp. 46-51.

Pal DK, Maity P and Samanta K. (2010). *In vitro* Antioxidant Activity of Leaves of *Ficus rumphii* Blume. *Asian Journal of Chemistry*, 22(10): 8246-8248.

Pandey KB and Rizvi SI. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5): 270–278.

Patel M, Verma R & Srivastav P. (2014). Antioxidant Activity of *Boerhavia diffusa* Extract. *IJPPR*, 6 (3): 598-605.

Pepeljnjak S., Kalodera Z. & Zovko M. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids from *Pelargonium radula* (Cav.) L'Hérit. *Acta Pharm.* 55: 431–435.

Perrini R, Morone-Fortunato I, Lorusso E. & Avato P. (2009). Glands, essential oils and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman. *Industrial Crops and Products*. 29 : 395–403.

Petersen D. (2015). Immortelle Essential Oil and Extract. *Journal of the American Herbalists Guild*. 13(1), 21-27

Pincemail J., Le Goff C. Charlier P., Gillion JP., Cheramy-Bien E., Van Honacker JP., Chapelle J. & Defraigne JO. (2009). Evaluation biologique du stress oxydant. *Nutrition et Endocrinologie Rev Med Liege Special antioxydant* 16-31.

Pirson Nathalie, Dominique Maiter, Orsalia Alexopoulou. (2016). Prise en charge du diabète gestationnel : une revue de la littérature. *Endocrinologie et Nutrition* : 661-668

Pitchaipillai R & Ponniah T. (2016). *In Vitro* Antidiabetic Activity of Ethanolic Leaf Extract of *Bruguiera cylindrica* L- Glucose Uptake by Yeast Cells Method. *Int. Biol. Biomed. J*; 2(4), 171-175.

Prakash HS & Bharathi TR. (2017). Comparative evaluation of antidiabetic and antioxidant potency of different extracts obtained from *Memecylon* species. *Int J Pharm Pharm Sci*, 9(2): 187-191.

Prieto P, Pineda M, Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of Vitamin E1. *Anal. Biochem*. 269: 337–341.

Punthakee Z, Goldenberg R, Katz P. (2018) Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert Committee. *Can J Diabetes* 42, S10–S15

Quezel P. & Santa S. (1962). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In: CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris.

Rahmani S, Belboukhari N, Sekkoum Kh, Cheriti A. (2016). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles *Limoniastrum feei* (plumbaginacea). *Algerian journal of arid environment*, 6(1): 80-86

Rai N, Vyas S & Phadnis P. (2016). Evaluation of analgesic activity of *Ficus racemosa* leaf extract using acetic acid induced writhing method in mice *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 5(1):60-64

Rajagopal K. & Sasikala K. Antihyperglycaemic and antihyperlipidaemic effects of *Nymphaea stellata* in alloxan-induced diabetic rat. *Singapore Med. J.* 49: 137-141.

Ramadevi M, Sivasubramanian N, Tamil Selvan A, Sree Giri Prasad B, Anbazhagan S. (2014). Screening of *in vitro* anti-inflammatory activity of *ficus virens* bark. *JGTPS*, 5(4): 2034–2036.

Ramanathan S, Vijaya PP, Yogananth N & Syed Ali M. (2014). *In vitro* evaluation of antidiabetic potential of *Gymnema sylvestre* and *Dregea volubilis* a medicinally important *Asclepiadaceae* plant. *International Journal Comprehensive Research in Biological Sciences*, 1(1):9-12.

Recio MC, Giner R, Terencio MC, Sanz MJ, & Rios JL. (1991). Anti-Inflammatory Activity of *Helichrysum stoechas*. *Planta Med.* 57(2): 1-2.

Rohilla A & Ali S. (2012). Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 3 (2):2229-3701.

Rosa A, Pollastro F, Atzeria A, Appendino G, Melis M.P, Deiana M, Incania A, Lorua D, Dessì M A. (2011). Protective role of arzanol against lipid peroxidation in biological systems. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164: 24–32.

Rosa A, Deiana M, Atzeri A, Corona G, Incani A, Melis MP, Appendino G, Dessì MA. (2007). Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated α pyrone – phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *Microphyllum*. *Chemico-Biological Interactions*. 165(2):117-126.

Rousselet MC, Vignaud JM, Hofman P, Chatelet FP. (2005). Inflammation et pathologie inflammatoire. *AFECAP*, 1-75.

Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*. 10: 1003-1008.

Saeed N, Khan MR & Shabbir M. (2012). Activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *Complementary and Alternative Medicine*, 12:221. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-221>.

Saha S, Barua B and Sikdar D. (2017). Phytochemical screening, phenolic content and antioxidant activity of wild date palm (*Phoenix sylvestris* Roxb.) fruit extracted with different solvents. *International Food Research Journal* , 24(6): 2534-2542.

Sairam S and Urooj A. (2013). *Artocarpus altilis* – Mode of anti-hyperglycemic activity: Elucidation by suitable *in-vitro* and *ex-vivo* techniques. *IJPSR*, 4(8): 3013-3019.

Sairam S and Urooj A. (2012). Effect of *Artocarpus altilis* on Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes and Glucose Uptake by Yeast Cells: An Exvivo Study *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 18:140–151.

Sala A, Recio MC, Schinella GR, Manez S, Giner RM, Cerda-Nicolas M, Rios JL. (2003a). Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology* 461, 53–61.

Sala A, Recio MC, Schinella GR, Manez S, Giner RM, Rios JL. (2003b). A new dual inhibitor of arachidonate metabolism isolated from *Helichrysum italicum*. *European Journal of Pharmacology* 460, 219–226.

Sala A, Recio MDC, Giner RM, Manez S, Tournier H, Schinella G, Rios JL. (2002). Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of *Helichrysum italicum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54:365–371.

Sala A, Recio MDC, Giner RM, Manez S, Rios JL. (2001). New acetophenone glucosides isolated from extracts of *Helichrysum italicum* with anti-inflammatory activity. *Journal of Natural Products* 64:1360–1362.

Salvi M.A.P. (2017). Screening of phytoconstituents and *In-vitro* anti-diabetic and anti-inflammatory activity of fruits of *Terminalia chebula*. *Journal of Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. 3(3): 229-237.

Sampath K P, Dheeba B, Suganya G, Sivakumar R. (2014). *In vitro* antidiabetic, antioxidant and anti-inflammatory activity of *Clitoria ternatea* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*. 6(7):342-347.

Selvakumar K, Bavithra S, Suganthi M, Benson C. S, Elumalai P, Arunkumar R, Krishnamoorthy G, P Venkataraman P, Arunakaran J. (2011). Protective Role of Quercetin on PCBs-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Hippocampus of Adult Rats. *Neurochem Res*. DOI 10.1007/s11064-011-0661-5.

Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 3(1): 91-100.

Shah BN & Seth AK. (2010). Screening of *Lagenaria siceraria* fruits for their analgesic activity. *Rom. J. Biol. – Plant Biol*, 55(1): 23–26.

Sharma VK, Kumar S, Patel HJ and Hugar S. (2010). Hypoglycemic activity of *Ficus glomerata* in alloxan induced diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1(2) : 18-22.

Sheikh N, Kumar Y, Misra AK, Pfoze L. (2013). Phytochemical screening to validate the ethnobotanical importance of root tubers of *Dioscorea* species of Meghalaya, North East India. *Journal of Medicinal Plants Studies* 1(6): 62- 69.

Shirwaikar A, Devi S, Siju E N. (2011).Anti-Inflammatory activity of *Thespesia populnea* fruits by Membrane Stabilization. *Int .J. Pharm Tech Res*, 3(4): 2060-2063.

Sigal RJ, Armstrong MJ, Colby P , Kenny GP, Plotnikoff RC, Reichert SM, Riddell MC. (2013). Activité physique et diabète. Canadian Diabetes Association. *Can J Diabetes*, 37(5) : S403-S408. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2013.07.047>

Silva L, Rodrigues AM, Ciriani M, Falé PLV, Teixeira V, Madeira P, Machuqueiro M, R Pacheco, Florêncio MH, Ascensão L, Serralheiro MLM. (2017). Antiacetylcholinesterase activity and docking studies with chlorogenic acid, cynarin and arzanol from *Helichrysum stoechas* (Lamiaceae) *Med Chem Res*. DOI 10.1007/s00044-017-1994-7.

Sinha SK, Ahmad I & Gayathri M (2013). Antidiabetic effect of Ethanol extracts of *Syzygium jambolanum* seed (*In-Vitro*). *Int. J. Drug. Dev. and Res*. 5 (3): 187-191.

Singh M P and Pathak K.(2015). Animal models for biological screening of anti-diabetic drugs: *An overview European Journal of Experimental Biology*, 5(5):37-48

Singh Y, Govindasamy J and Upadhayay A. (2016). Anti-hyperglycemic evaluations of herbal drug combinations by *in vitro* methods. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(12): 949-958.

Sobhy EA. & El-Feky SS. (2007). Chemical constituents and antimicrobial activity of *Helichrysum stoechas*. *Asian Journal of Plant Sciences*, Vol 6 (4): 692–695.

Sobiecki JF. (2014). The intersection of culture and science in South African traditional medicine. *Indo-Pacific Journal of Phenomenology*, 14(1), 1-10.

Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G. (2006). Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res*. 19, 550–571. doi: 10.1111/j.1600-0749.2006.00334.x

Subhan N, A Alam, F Ahmed, I Z Shahid. (2008). Antinociceptive and gastroprotective effect of the crude ethanolic extracts of *Excoecaria agallocha* linn. *Turk J. Pharm. Sci*. 5 (3): 143-154.

Sugihara H, Nagao M, Harada T, Nakajima Y, Tanimura-Inagaki K, Okajima F, Tamura H, Inazawa T, Otonari T, Kawakami M, Oikawa S. (2014). Comparison of three α -glucosidase inhibitors for glycemic control and body weight reduction in Japanese patients with obese type 2 diabetes. *J Diabetes Invest*, 5(2): 206–212.

Sulaiman MR, Zakaria ZA, Bujarimin AS, Somchit MN, Israf DA, Moin S. (2008).Evaluation of *Moringa oleifera* aqueous extracts for antinociceptive and anti-inflammatory activities in animal models. *Pharmaceutical biology*; 46(12):838-845. DOI:10.1080/13880200802366710.

Sultana B, Anwar F & Ashraf M. (2009). Effect of Extraction Solvent/Technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14: 2167-2180; doi:10.3390/molecules14062167.

Sumathi S. & Anuradha R. (2016). *In vitro* anti-inflammatory activity of flower extract of *Couroupita guianensis* aubl. *Innov J Ayurvedic Sci*, 4(3): 16-18.

Süzgeç-Selçuk S & Birteksöz AS. (2011). Flavonoids of *Helichrysum chasmolycicum* and its antioxidant and antimicrobial activities. *South African Journal of Botany*, 77: 170–174.

Syiem D, Monsang Sh W & Sharma R. (2010). Hypoglycemic and anti-hyperglycemic activity of *Curcuma amada roxb.* In normal and alloxan-induced diabetic mice. *Pharmacologyonline*, 3: 364-372.

Syiem D & Warjri P. (2011). Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of aqueous extract of *Ixeris gracilis* DC. On normal and alloxan-induced diabetic mice. *Diabetologia Croatica* , 40(3): 89-95.

Szkudelski T. (2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in β Cells of the Rat Pancreas. Mini Review *Physiol. Res.* 50: 536-546.

Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. (2006). Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol.* 52(2):149-53.

Tatli II, Sahpaz S, Akkol E K, Nizard FM, Gressier B, Ezer N and Bailleul F. (2009). Antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of Turkish medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, 47(9): 916–921.

Tamilselvi N, Krishnamoorthy P, Dhamotharan R, Sagadevan E. (2012). Analysis of total phenols, total tannins and screening of phytochemicals in *Indigofera aspalathoides* (Shivanar Vembu) Vahl EX DC. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4(6): 3259-3262.

Tamiru W, Engidawork E & Asres K. (2012). Evaluation of the effects of 80% methanolic leaf extract of *Caylusea abyssinica* (fresen.) fisch. and Mey. on glucose handling in normal, glucose loaded and diabetic rodents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12:151. doi: [10.1186/1472-6882-12-151](https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-151).

Tchamgoue AD, Tchokouaha L RY, Domekouo ULF, Atchan A PN, Tarkang PA, Kuate JR, Agbor GA. (2016). Effect of *Costus afer* on Carbohydrates Tolerance Tests and Glucose Uptake. *Sch. Acad. J. Biosci*, 4(6):459-469.

Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA. (2005). *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chemistry*. 90(4): 685-689.

- Tesema S & Makonnen E. (2015). *In vivo* analgesic and antipyretic activities of n-butanol and water fractions of *Ocimum suave* aqueous leaves extract in mice. *Ethiop J Health Sci.* 25(2): 139-146.
- Thiefin G. (2003). Complications gastro-intestinales des anti-inflammatoires non stéroïdiens et de l'aspirine à faible dose. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 27(5): 498-510.
- Tiwari AK. and Rao JM. (2002). Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: Present status and future prospects. Review article. *Current Science*, 83(1).
- Tomás-Barberán F, Iniesta-Sanmartín E, Tomás-Lorente F, Rumberoa A. (1990). Antimicrobial phenolic compounds from three Spanish *Helichrysum* species. *Phytochemistry*. 29(4): 1093-1095.
- Trabut L, (2006). Noms indigènes des plantes d'Afrique du Nord. Edition Ibis Press, Paris. p 127.
- Tripathi KD. (2013). Essentials of Medical Pharmacology Seventh Edition Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd
- Uddin MMN, Emran TB, Mahib MMR & Dash R.(2014). Molecular docking and analgesic studies of *Erythrina variegata*'s derived phytochemicals with COX enzymes. *Bioinformation* 10(10): 630-636.
- Ukwuani. A. N & Hassan. I. B (2015). *In vitro* anti-inflammatory activity of hydromethanolic seed, fruit and leave extracts of *Capsicum chinense* (Red pepper). *EJBPS*, 2(2): 57-65.
- Ullah H M A, Zaman S , Juhara F , Akter L , Tareq S M, Masum E H and Bhattacharjee R.(2014). Evaluation of antinociceptive, in-vivo & in-vitro anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Curcuma zedoaria* rhizome. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14:346 pp: 1-12. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/346>.
- Vadivu R & Lakshmi KS. (2008). *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchinensis* (Lour) Moore ssp *Laurina*. *Bangladesh J Pharmacol*, 3:1-4. DOI: 10.3329/bjp.v3i2.956
- Van Vuuren S.F, Viljoen AM, van Zyl RL, van Heerden F.R, Husnu K, Baser C. (2006). The antimicrobial, antimalarial and toxicity profiles of helihumulone, leaf essential oil and extracts of *Helichrysum cymosum* (L.) D. Don subsp. *Cymosum*. *South African Journal of Botany*. 72: 287 – 290.
- Veena ME, Niranjana P, Sharanappa P, Achur RN. (2016). Analgesic activity of *Cryptocarya stocksii* plant by hotplate method. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(1): 39-41.
- Vinayagam R & Xu B. (2015). Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutrition & Metabolism* , 12 (60): 1-20. doi: 10.1186/s12986-015-0057-7.

Vladimir-Knežević S, lažeković BB, Štefan MB, Alegro A, Kőszegi T and Petrik J. (2011). Antioxidant Activities and Polyphenolic Contents of Three Selected *Micromeria* Species from Croatia. *Molecules* 16, 1454-1470. doi:10.3390/molecules16021454.

Waghmare AA, Narwade VT, Ladda RG, Rathod GM, Deshmukh VL. (2010). Qualitative detection of kaempferol and myricetin from *Euphorbia indica* L. *Journal of Ecobiotechnology* 2(6), 56.

Wherrett D, Huot C, Mitchell B, Pacaud D. (2013). Le diabète de type 1 chez les enfants et les adolescents. « Canadian Diabetes Association ». *Can J Diabetes* 37(5): S531-S541

Wiczowski W, Németh K, Buciński A, Piskula MK. (2003). Bioavailability of quercetin from flesh scales and dry skin of onion in rats. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 12(53): 95-99.

Yang T and Poovaiah BW. (2002). Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium-calmodulin. *PNAS*, 99(6): 4097–4102

Yıldırım I & Kutlu T. (2015). Anticancer Agents: Saponin and Tannin. *International Journal of Biological Chemistry*, 9 (6): 332-340.

Yıldırım A, Mavi A, Kara A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J Agric Food Chem*, 49(8): 4083-4089. DOI: 10.1021/jf0103572.

ANNEXES

Annexe.1

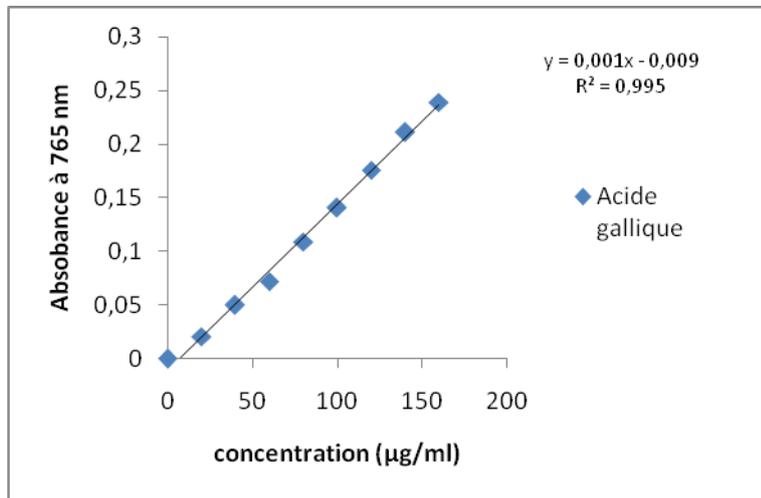


Figure.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

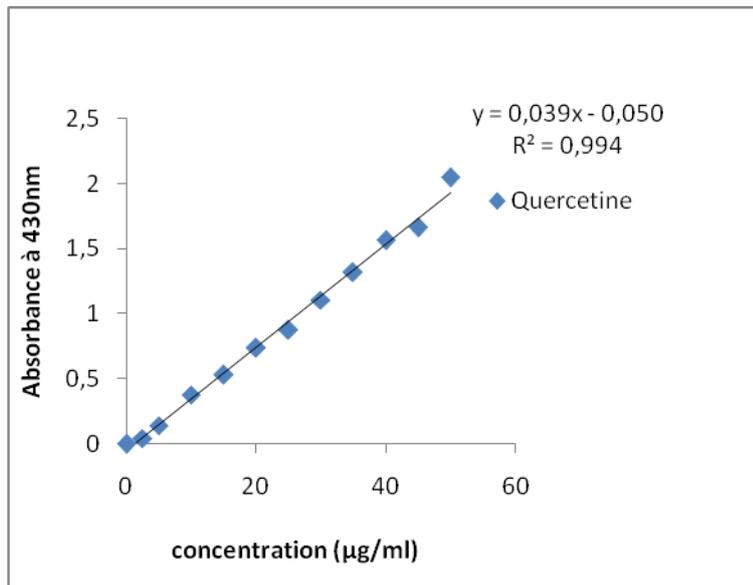


Figure.2 : Courbe d'étalonnage de la quercetine

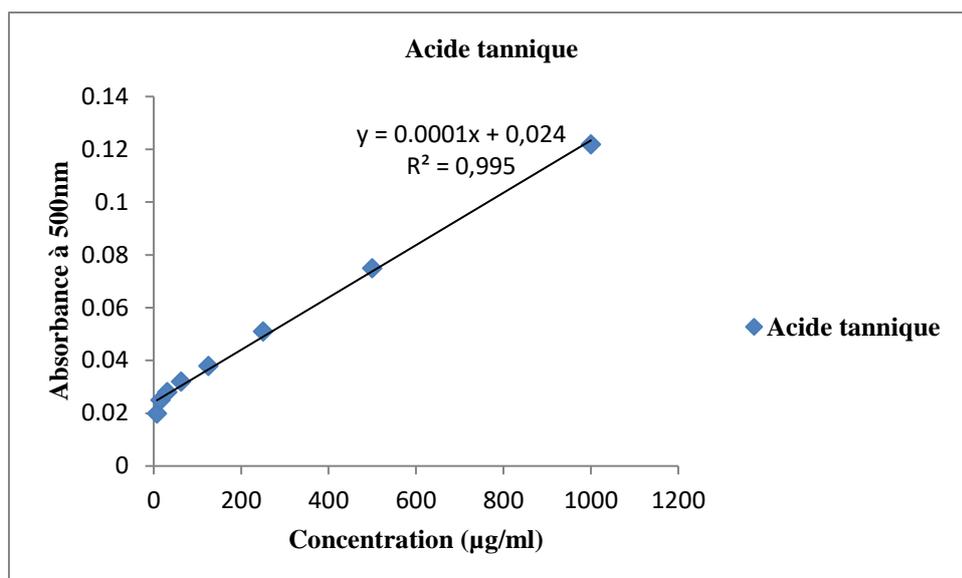


Figure.3 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique

Annexe.2

Activité antioxydante

Tableau.1 : Activité antiradicale des extraits de l' *Helichrysum stoechas* et l'acide ascorbique

[c] (µg/ml)	% Inhibition DPPH					
	Extrait ethanolique			Extrait aqueux		BHT
	Mac	Dec	Soxhelet	Mac	Dec	
6,25	7,781±0,389	14,772 ± 1,442	12,205±1,163	1,774±0,658	10,963±0,191	8,590±0,137
12,5	17,184±1,666	23,051 ± 1,355	27,251±1,092	11,091±2,209	23,013±0,846	15,303±0,339
18,75	24,198±1,030	34,202 ± 1,133	38,801±0,917	14,318 ±2,864	32,840 ±5,950	25,422±0,366
25	30,260±0,393	48,175 ± 1,614	54,370±1,390	19,209±1,533	48,667±3,955	39,782±0,958
31,25	39,256±0,599	57,448 ± 1,233	65,913±1,808	24,029 ±3,360	64,623 ±1,455	62,555±0,858
37,5	42,109±0,241	69,178 ± 6,300	77,627±1,215	30,115±3,730	76,155±1,228	75,530±0,662
43,75	54,175±2,183	80,693 ± 3,686	82,105±1,391	36,579±3,642	80,892±0,361	82,259±0,130
50	67,817±4,446	88,637 ± 2,828	89,847±1,749	48,676±7,242	86,431±1,963	84,971±0,472
IC50	39,697±0,636	27,132 ±0,423	25,131±0,643	63,194 ±3,017	39,697± 0,636	45,414 ± 0,371

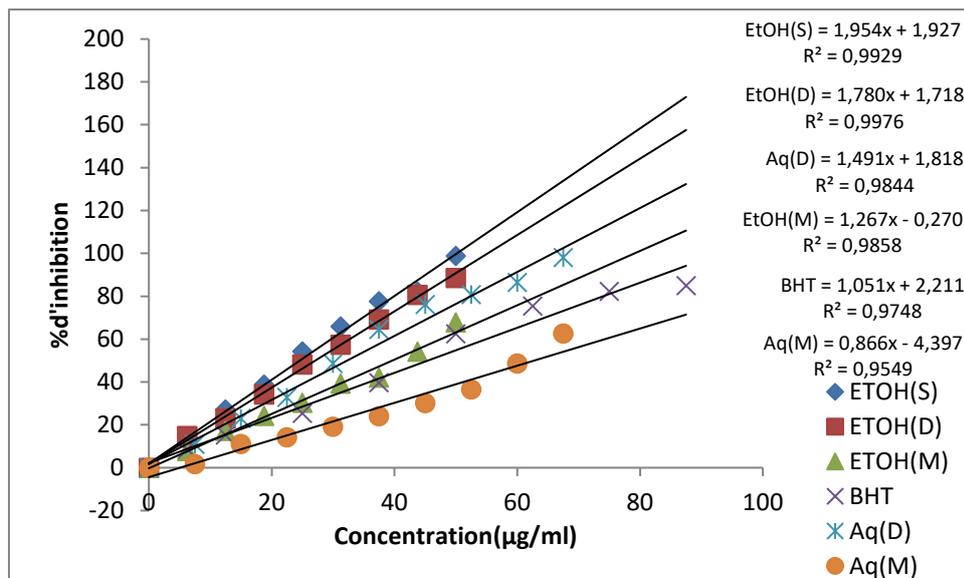


Figure.4 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de différents extraits et le standard (BHT)

Tableau 2. Détermination de l'activité antioxydante des extraits ethanologique, aqueux et acide ascorbique par peroxyde d'hydrogène

Absorbance de controle= 1,357 à 230 nm

C] (µg/ ml)	% Inhibition H ₂ O ₂					
	Extrait ethanologique A			Extrait aqueux		A.ascorbique
	EtOH _(M)	EtOH _(D)	EtOH _(S)	Aq _(M)	Aq _(D)	
10	11,763±0,034	22,299±0,423	12,33±0,222	5,51±1,034	9,43±,022	35,66±0,211
20	15,260±1,146	28,340±0,154	31,73±0,077	12,67±0,115	17,80±0,087	46,64±0,152
40	26,572±0,085	30,525±0,117	42,63±0,024	16,48±0,847	25,64±0,025	57,52±0,263
80	35,143±0,082	39,514±0,030	55,16±0,048	23,14±1,313	38,34±0,069	65,64±0,111
100	47,864±0,072	51,203±0,094	73,31±0,324	31,24±1,094	47,86±0,072	72,25±0,297
140	52,284±0,025	69,696±0,120	78,46±0,057	45,90±0,235	54,74±0,171	80,67±0,146
180	71,095±0,040	75,975±0,333	85,44±0,200	53,71±0,126	63,36±0,403	89,12±0,336
200	78,930±0,206	80,628±0,291	90,62±0,552	65,10±0,280	70,92±0,167	96,37±0,268
IC50	118,73±0,475	96,965±0,575	72,75±0,407	158,773±1,483	126,027±0,537	32,90±0,681

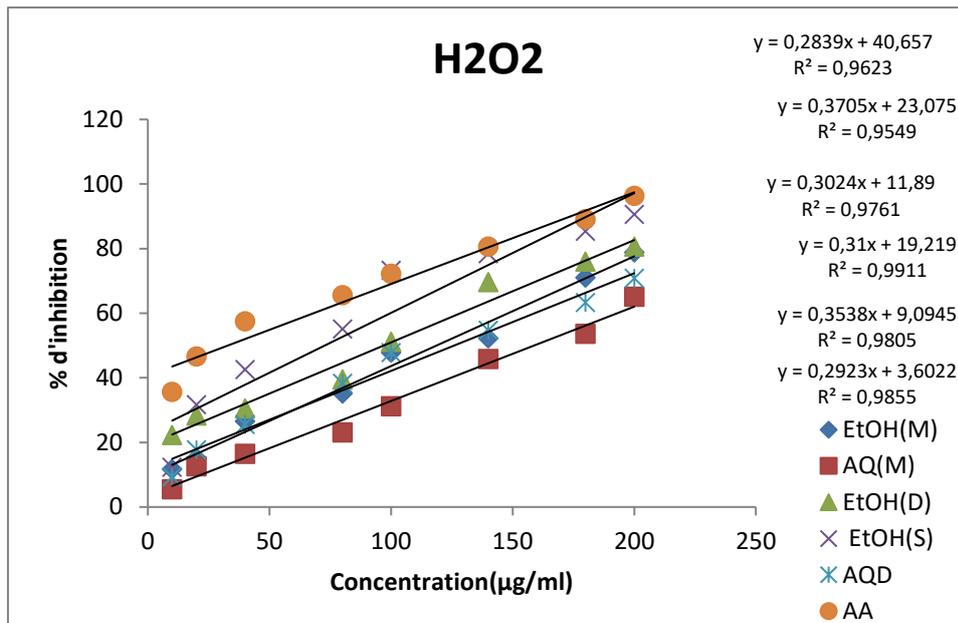


Figure. 5 : Pourcentage d'inhibition du H2O2 en fonction des concentrations de différents extraits et le standard (Acide ascorbique)

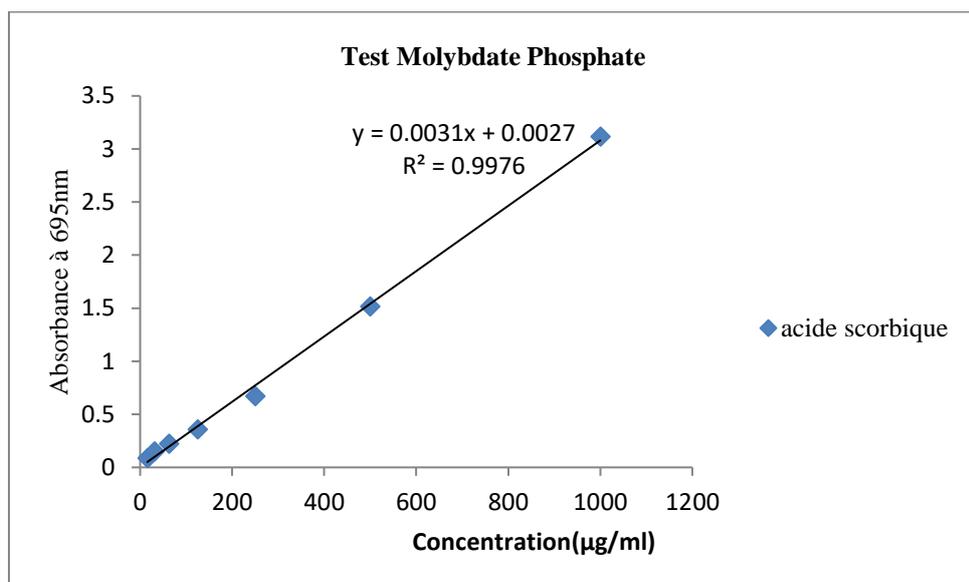
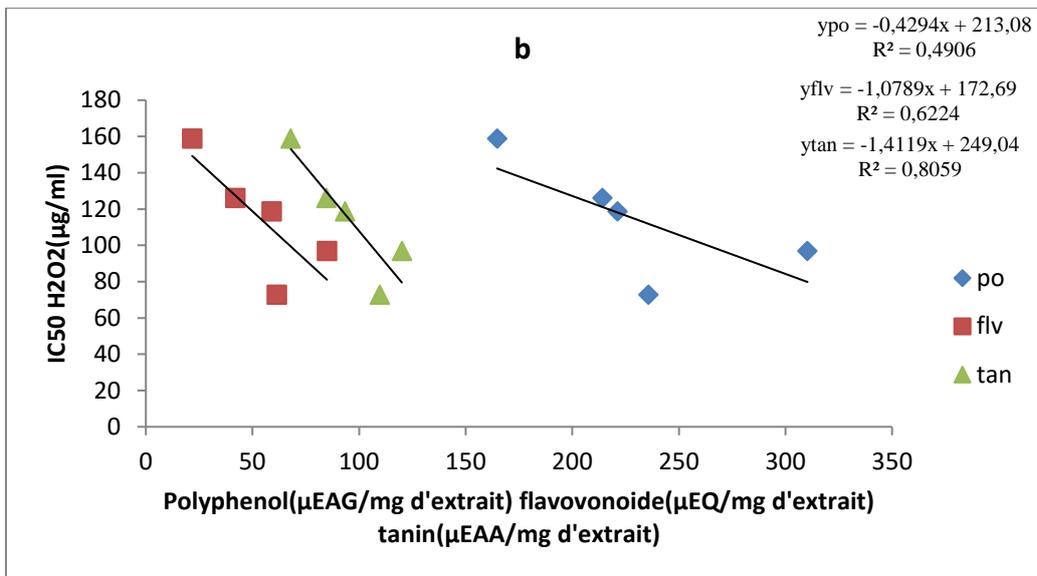
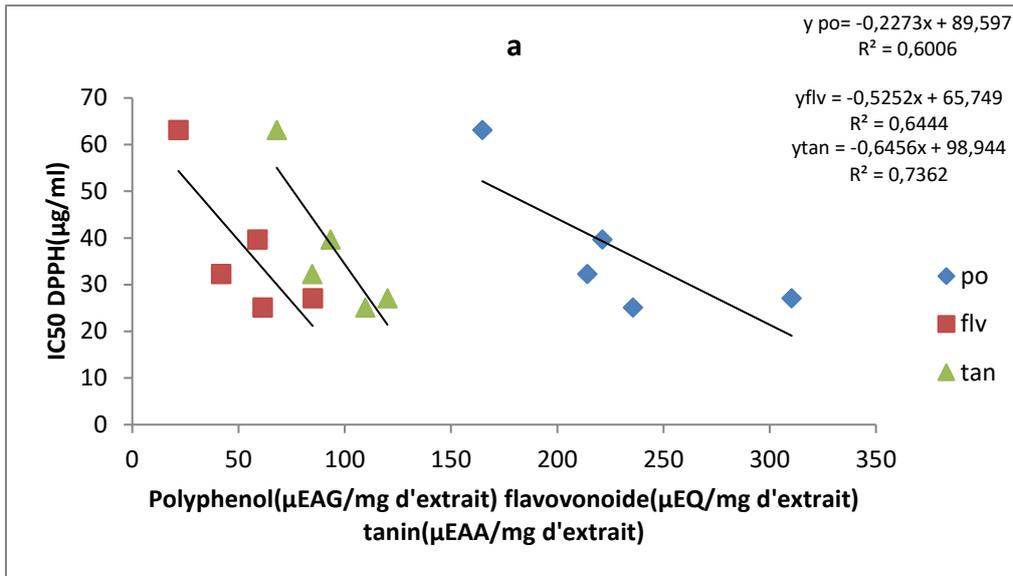


Figure. 6: Courbe d'étalonnage de l'activité antioxydante par phosphomolybdate d'ammonium



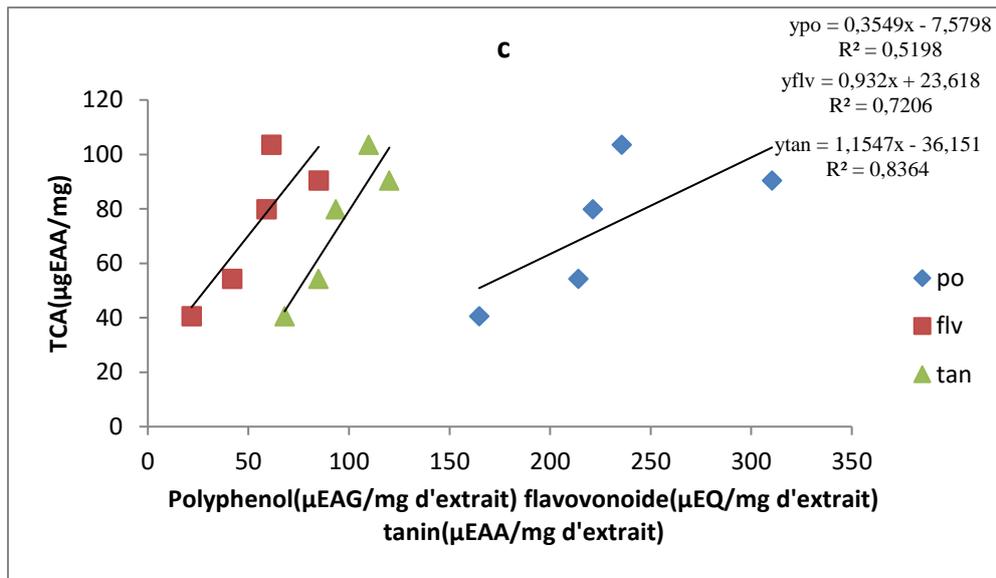


Figure.7 : Corrélation entre polyphénols, flavonoïdes, tanins des extraits et l'activité antioxydante, (a) : essai de DPPH, (b) de H₂O₂, (c) au molybdate et (d) au Frap

Activités antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Helichrysum stoechas* (L.) Moench

Antioxidant and Antibacterial Activities of the Extracts of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench

H. Boubeker · K. Rebbas · R. Belhattab

© Lavoisier SAS 2017

Résumé L'objectif de ce travail est d'évaluer les activités antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Helichrysum stoechas* issues de deux méthodes d'extraction : d'une part, macération et décoction, d'autre part, l'eau et l'éthanol comme solvants. Les extraits contiennent une quantité considérable en métabolites phénoliques, déterminées par la méthode de Folin-Ciocalteu, comprise entre 310,337 et 188,742 µg/ml. Les activités antioxydantes de la plante ont été évaluées sur les extraits par la réduction de DPPH avec de l'hydroxytoluène butylé comme antioxydant standard. Les résultats de ce test ont montré que les extraits éthanoli-ques isolés par décoction ont de très bonnes activités antioxydantes par rapport aux extraits obtenus par macération (27,132 µg/ml). De plus, il existe une corrélation positive ($[R^2 = 0,679]$, $[R^2 = 0,673]$) entre ces activités et les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes respectivement. Les tests antibactériens ont été réalisés sur des souches bactériennes de référence ATCC (American Type Culture Collection) dans un milieu solide en utilisant la méthode des puits, montrant que certaines bactéries testées sont sensibles aux extraits éthanoli-ques telles que *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* et *Klebsiella pneumoniae*, avec des valeurs de diamètre d'inhibition comparables à celles des antibiotiques testés. Par contre, d'autres sont résistantes comme *Escherichia coli*. Les extraits aqueux obtenus par les deux méthodes d'extraction (décoction, macération)

sont inefficaces pour la majorité des bactéries étudiées, sauf *Klebsiella pneumoniae*.

Mots clés *Helichrysum stoechas* (L.) Moench · Macération · Décoction · Activité antioxydante · Activité antibactérienne

Abstract The objective of this work was to evaluate the antioxidant and antibacterial activities of the extracts of *Helichrysum stoechas* from two extraction methods (maceration and decoction) using two solvents, water and ethanol. The extracts contain a considerable amount of phenolic metabolites between 310.337 and 188.742 µg/ml determined by the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity of this plant was evaluated using the extracts by reducing DPPH (2,2-Diphenyl 1-picrylhydrazyl hydrate) radical scavenging with butylated hydroxytoluene (BHT) as standard antioxidant. The results of this test showed that ethanolic after decoction extracts have very good antioxidant properties compared with extracts obtained by maceration (27.132 µg/ml). In addition, there is a positive correlation ($[R^2 = 0.679]$, $[R^2 = 0.673]$) between these activities and the contents of total polyphenols and flavonoids, respectively. Antibacterial tests were determined using ATCC reference bacterial strains according to the Agar-well diffusion method, showing that certain bacteria tested are sensitive to ethanol extracts as *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, and *Klebsiella pneumoniae* with diameter of inhibition values comparable with the antibiotics tested. There are other bacteria which are insensitive to different extracts of *Helichrysum stoechas* such as *Escherichia coli*. The aqueous extracts obtained by the two extraction methods (decoction and maceration) are ineffective for the majority of bacteria tested, except *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords *Helichrysum stoechas* (L.) Moench · Maceration · Decoction · Antioxidant activity · Antibacterial activity

H. Boubeker (*)

Département de microbiologie et biochimie, faculté des sciences, université Mohamed-Boudiaf, M'Sila, Algérie
e-mail : rebbaskhellaf@yahoo.fr

K. Rebbas

Département des sciences de la nature et de la vie, faculté des sciences, université Mohamed-Boudiaf, M'Sila, Algérie

R. Belhattab

Département de biochimie, faculté des sciences de la nature et de la vie, université Ferhat-Abbas, Sétif, Algérie

الملخص

الغرض من هذه الدراسة هو المساهمة في تثمين نبتة *Helichrysum stoechas* الطبية واستخداماتها في الطب التقليدي الجزائري. سمح التحليل الكيميائي النباتي بالاعتراف على عديدات الفينول، الفلافونويدات، القلويدات، الدباغ، الستيرولات و التربينات الثلاثية. تم الاستخلاص بثلاث طرق مختلفة، طريقة النقع، الغلي وطريقة Soxhlet بواسطة الماء والايثانول كمذيبين. تم تقييم النشاط المضادة للأكسدة باستعمال طريقة الجذور الحرة (DPPH) و بيروكسيد الهيدروجين والقدرة الارجاعية فكانت $IC_{50} = 25.13 \pm 0.643$ ، $72,75 \pm 0,407$ و $83,939 \pm 0,578$ $\mu\text{g/ml}$ على الترتيب. تقييم النشاط المضاد للميكروبات لمختلف المستخلصات بتحديد التركيز الأدنى المثبط CMI تجاه خمس سلالات بكتيرية مرجعية و الخميرة *Candida albicans*. أظهرت بكتيريا *K. pneumonia* (ATCC4352) و *S. aureus* أكبر حساسية حيث كانت $CMI = 19.53$ و $39,062 \mu\text{g/ml}$ على التوالي. في حين *C. albicans* أظهرت $156.5 \mu\text{g/ml}$. بينت المعاملة بالمستخلص المائي بتركيز 1000 مع/كغ. و.ج انخفاض ملحوظ فينسبة سكر الدم في حين أظهر الدواء الرجعي، Metformine 59.97%. في اختبار في الزجاج، ثبط هذا المستخلص أنزيم α -اميلاز، سهل عبور الجلوكوز خلال غشاء الخميرة و خفض تشكل المعقد هيمو غلوبين-جلوكوز. تم اختبار النشاط المضاد للالتهاب للمستخلص الاثانولي، في الحي، باعتماد طريقة وزمة الرجل. كان تثبيط الوزمة اكثر فعالية مقارنة بدواء Diclofénac عند تركيز 100 مع/كغ خلال نفس الفترة. كما تم تقدير النشاط المضاد للالام للمستخلص الاثانولي للنبتة باستعمال طريقة غمر الذيل، السطح الساخن، و اختبار الانتواء عند الفأر، فاستخلص أن الفعل المضاد للالام يتم بطريقة مركزية. قلص مستخلص الكحول من عدد التقلصات اللاإرادية وذلك باستعمال حمض الأسيتيك مما يفسر علاجه للألم السطحي.

الكلمات المفتاحية: *Helichrysum stoechas*، تحليل كيميائي نباتي، عديدات الفينولات، الفلافونويدات، الفعالية البيولوجية.

Résumé

Le but de cette étude est de contribuer à la valorisation de *Helichrysum stoechas* et la validation de son utilisation en médecine traditionnelle algérienne. Le screening phytochimique a mis en évidence la présence de polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, stérols et triterpènes. Trois méthodes d'extraction, la macération, la décoction et le Soxhlet, avec l'eau et l'éthanol comme solvants. L'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de piégeage des radicaux libres (DPPH) et du peroxyde d'hydrogène et du pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique (EtOH_S) a montré une CI₅₀ de 25,13±0,643, 72,75±0,407 et de 83,939±0,578 µg/ml respectivement. L'activité antimicrobienne en termes de CMI est déterminée sur cinq souches bactériennes et une levure *Candida albicans*. En effet, *K. pneumonia* (ATCC4352) et *S. aureus* sont les germes les plus sensibles avec une CMI de 19,53 et 39,062 µg/ml respectivement, cependant celle de *C. albicans* est de 156,5 µg/ml. Le traitement par l'extrait aqueux à la dose de 1000 mg/kg p.c. a montré une baisse plus efficace de la glycémie (62,84%), cependant le médicament de référence, Metformine a montré 59,97%. *In vitro*, l'extrait a inhibé l' α -amylase, facilité la pénétration du glucose à travers la membrane de la levure et diminue la formation du complexe hémoglobine - glucose. L'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques a été explorée *in vivo* par l'induction de l'œdème de la patte. L'inhibition de l'œdème a été plus efficace que celle obtenue avec le Diclofénac à 100mg/kg au cours de la même période. L'activité analgésique de l'extrait éthanolique de la plante a été évaluée selon la méthode de l'immersion de la queue, la plaque chaude et le test de torsion chez la souris., déduisant son activité analgésique à médiation centrale. L'extrait éthanolique a réduit le nombre de spasmes induits par l'acide acétique, ce qui suggère son activité analgésique périphérique.

Mots clés : *Helichrysum stoechas* (L) Moench, screening phytochimique, polyphénols, flavonoïdes, activité biologique

Abstract

The purpose of this study was to valorize *Helichrysum stoechas* a medicinal plant and to validate its use in Algerian traditional medicine. Phytochemical screening revealed the presence of polyphenols, flavonoids, alkaloids, tanins, sterols and triterpenes. Three extraction methods, maceration, decoction and soxhlet, using water and ethanol as solvents were performed. The evaluation of the antioxidant activity by the method of free radical scavenging (DPPH), trapping of hydrogen peroxide and reducing activity showed IC_{50} values of 25.13 ± 0.643 , 72.75 ± 0.407 and 83.939 ± 0.578 $\mu\text{g} / \text{ml}$ respectively for ethanol extract EtOH_(S). The antimicrobial activity in terms of MIC was determined for five bacterial strains and one yeast species *Candida albicans*. In fact, *K. pneumonia* (ATCC4352) and *S. aureus* are the most sensitive with a MIC of 19.53 and 39.062 $\mu\text{g} / \text{ml}$ respectively, whereas that of *C. albicans* is 156.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Treatment with the aqueous extract at a dose of 1000 mg / kg p.c. showed more effective decrease in blood glucose (62.84%) whereas the reference drug, Metformin showed 59.9%. *In vitro*, the extract inhibits α -amylase, facilitates the penetration of glucose across the yeast membrane and reduces the formation of the hemoglobin-glucose complex. The anti-inflammatory activity of the ethanolic extracts was investigated *in vivo* by induction of paw edema. The inhibition was more effective than that obtained with Diclofenac 100 mg / kg during the same period. The analgesic activity of the ethanolic extract of the plant was evaluated using the method of tail immersion, hot plate and torsion test in mice, deducing its centrally mediated analgesic activity. The ethanolic extract reduced the number of spasms induced by acetic acid, suggesting its peripheral analgesic activity.

Key words: *Helichrysum stoechas* (L) Moench, phytochemical screening, polyphenols, flavonoids, tannins, biological activity

