



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمدة لخضر الوادي
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
كلية علوم الطبيعة و الحياة
Département de biologie Cellulaire et Moléculaire
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En Vue de l'obtention du diplôme de Master Aca-démique en Sciences biologiques
Spécialité : toxicologie

THEME

Évaluation in vitro et in silico des activités biologiques d'*Echiniops spinosissimus*

Présenté Par :

Melle BEN YAHIA Wissal
Melle SLIMANI Wafa
Melle DRICHE Aya

Devant le jury composé de :

Président: Dr.Bouras Biya	MCA Université d'El oued
Examinatrice: Dr .Mkhadmi Nour Elhouda	MCA Université d'El oued
Encadreuse: Dr. Adaika aicha	MCB Université d'Eloued

Annee Université : 2025/2026



Dédicace

بسم الله الرحمن الرحيم

(وَأَنْ لَّيْسَ لِلْإِنْسَانِ إِلَّا مَا سَعَى * وَأَنَّ سَعْيَهُ سَوْفَ يُرَىٰ)

Louange à Allah, Seigneur des mondes, et que la paix et les bénédictions soient sur le sceau des prophètes et des messagers.

À cette âme qui a affronté les défis sans jamais se rendre, en hommage à chaque nuit de veille et à chaque épreuve qui l'a rendue plus forte, avec la promesse que l'avenir sera plus beau par la grâce d'Allah.

À ma chère mère, la lumière qui dissipe l'obscurité de mes jours et la main qui ne m'a jamais abandonnée, et à mon cher père, l'homme au silence bienveillant qui m'a appris que les sommets ne s'atteignent que par la détermination, cette réussite est le fruit de votre éducation, qu'Allah vous préserve et bénisse vos années.

À mes chers frères et sœurs, et tout particulièrement à mon frère bien-aimé "Anwar", une partie de mon âme.. Il est parmi nous de corps, mais mon cœur pleure de nostalgie pour l'âme que je connais. Je demande à Allah de lui accorder une guérison rapide et de le rétablir tel qu'il était. Mon vœu le plus cher est qu'il soit au premier rang le jour de ma remise de diplôme, portant sa santé retrouvée comme il porte son sourire.. Et à quiconque lit ces mots, je lui demande au nom d'Allah une prière sincère pour mon frère, car la prière d'une personne pour son frère en son absence n'est jamais rejetée. À mes chères sœurs, l'épaule sur laquelle je me suis toujours appuyée.

À ma honorable professeure "Adaïka Aicha", un sauvetage et un guide sage qui a cru en mes capacités quand ma propre conviction m'a fait défaut, et à tous ceux qui ont contribué à ce travail.

Et à une âme qui se reconnaît sans que je la nomme, dont la présence a été une bénédiction dont je remercie Allah..

Je dédie ce travail non pas comme une conclusion, mais comme le début de ce qui sera plus beau, qu'Allah le veuille.

L'étudiante : Ben Yahia Wisal

Dédicace

Avant toute chose, et pour tout ce qui a été accompli, louange à Allah, Seigneur de l'univers.

Louange à Celui sans qui aucun effort n'aboutit et aucun travail ne s'accomplit.

Si j'ai pu surmonter les difficultés et les obstacles, ce n'est que par Sa grâce, Sa miséricorde et Son soutien.

Il ne m'est pas possible, en ce moment si particulier, de ne pas dédier le fruit de ce travail à ceux qui ont illuminé mon parcours :

À ceux dont Allah a dit :

« Seigneur, fais-leur miséricorde comme ils m'ont élevée toute petite. »

À ceux dont les prières m'ont accompagnée à chaque étape de ma vie et ont ouvert devant moi les portes de l'espoir lorsque la vie semblait les fermer.

À celle sous les pieds de qui se trouve le Paradis... Ma très chère mère

À ce cœur incomparable, À cette lumière qui a illuminé ma vie depuis le premier instant de mon existence.

Ma mère n'est pas seulement un mot, mais une patrie de tendresse et un océan inépuisable de prières.

À celle qui m'a portée avec fatigue et amour, qui a veillé pour moi lorsque le monde dormait autour d'elle, et qui a pleuré de joie pour moi avant même que je ne ressente cette joie moi-même.

À celle qui a toujours cru en moi, même lorsque je doutais de moi-même...

Je te dédie cette réussite, toi qui es la plus grande bénédiction qu'Allah m'ait accordée.

C'est grâce à tes prières que je suis arrivée jusqu'ici, grâce à ton amour que j'ai trouvé la force, et grâce à ton cœur que j'ai appris la patience.

Je t'aime d'un amour que les mots ne peuvent contenir et qu'aucune expression ne saurait décrire.

À mon cher père...

À celui qui m'a enseigné la force et la persévérance,

À celui dont la présence a toujours été une source de sécurité dans ma vie et dont les paroles m'ont encouragée à avancer malgré les difficultés,

Merci d'avoir toujours été une source de confiance et de fierté, ainsi qu'un soutien indéfectible à chaque étape de ma vie.

À mon frère et soutien, Marouane... À celui qui a été pour moi un frère, un ami et une épaule sur laquelle m'appuyer dans les moments difficiles, À celui qui ne m'a jamais laissée seule dans les épreuves et qui fut toujours parmi les premiers à me soutenir par ses paroles, son attention et sa bienveillance...

Merci d'avoir été cette force qui me relevait lorsque je faiblissais, et cette sérénité qui apaisait mon cœur lorsque la peur m'envahissait.

Ta présence dans ma vie est une immense bénédiction que les mots ne peuvent décrire.

À ma chère sœur Ahlam...

À celle qui a partagé mes peines avant mes joies,

À celle qui fut proche de mon cœur à chaque étape, m'écoutant lorsque j'étais fatiguée et allégeant mes peines lorsque les jours devenaient difficiles...

Merci d'avoir été une véritable sœur, remplie d'amour, de tendresse et de générosité.

Ta présence à mes côtés a rendu le chemin plus léger et les jours plus beaux. Je resterai toujours reconnaissante pour chaque instant où tu m'as soutenue avec sincérité et affection.

À ma petite sœur et compagne de route, Hiba...

À cette belle âme qui remplissait mes journées de joie et de chaleur,

À celle qui fut une amie avant même d'être une sœur,

Tu as grandi à mes côtés pas à pas et tu as toujours été une source de sourire et de force pour moi.

Ta présence dans ma vie ressemble à une lumière qui ne s'éteint jamais, et ton innocence ainsi que ton amour ont adouci la fatigue des jours difficiles.

À mon fiancé, Baha...

À celui qui a été mon véritable soutien tout au long de ce parcours, À celui qui m'a encouragée par ses paroles et qui est resté à mes côtés dans les moments de faiblesse et de fatigue,

Merci d'avoir toujours été une source de sérénité et de force pour moi, et d'avoir allégé les difficultés de ce chemin par ta présence.

Je resterai reconnaissante pour chaque instant où tu m'as soutenue avec amour et sincérité.

À ma respectueuse enseignante, Madame « Adayka Aïcha »...

À celle qui fut bien plus qu'une enseignante,

À cette personne bienveillante qui m'a transmis le savoir avec soutien et affection, et qui m'a accompagnée tout au long de ce parcours grâce à ses conseils sincères...

Merci d'avoir été pour moi une source d'inspiration et de confiance, et d'avoir su me redonner courage et espoir lorsque la fatigue me gagnait.

Je garderai toujours une profonde reconnaissance pour votre patience, votre attention et vos encouragements constants.

Veillez recevoir toute mon estime, mon respect et ma gratitude.

À mes amis et amies... À ces cœurs bienveillants qui m'ont offert soutien et affection sans rien attendre en retour, À tous ceux qui m'ont soutenue par une parole réconfortante, une prière sincère ou un sourire qui a allégé la difficulté du chemin,

Je vous adresse toute ma reconnaissance et mon affection.

Enfin, je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui ont cru en moi et ont contribué, de près ou de loin, à mon accomplissement.

Je prie Allah de vous récompenser généreusement, de vous accorder santé, bonheur et sérénité.

Wafa. Slimani



Dédicace

Je dédie l'aboutissement de mes études à ma famille, mon
unique soutien dans la vie,
à ceux qui ont partagé avec moi les moments de fatigue et
d'espoir.

Je tiens particulièrement à mentionner mon père,
dont les sacrifices pour nous ont été la plus grande leçon de
vie.

Je le dédie également à moi-même,
pour ne jamais avoir abandonné malgré toutes les difficultés,
fière de ma patience et de mes efforts jusqu'à atteindre ce jour.



Driche aya

Remerciements

Remerciements Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux. Louange à Allah, digne de Sa grandeur et de Sa majesté, qui a illuminé notre chemin vers le savoir et la connaissance, et nous a accordé la force et la persévérance nécessaires pour mener ce travail à son terme. Sans Sa grâce, Sa générosité et Son soutien, cet humble travail n'aurait pu voir le jour. Que la paix et les bénédictions soient sur le plus noble des prophètes et des messagers, notre maître Mohammed, ainsi que sur sa famille et ses compagnons. À l'achèvement de ce mémoire, il nous est particulièrement agréable d'exprimer nos plus sincères sentiments de gratitude et de reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Nous adressons nos plus profonds remerciements et notre haute considération à notre encadrante, Madame Adaïka Aïcha, qui a été pour nous une véritable guide scientifique. Par la qualité de ses orientations, la pertinence de ses conseils, la rigueur de son suivi, ainsi que par sa patience, son attention et ses encouragements constants, elle a largement contribué à l'aboutissement de ce travail dans les meilleures conditions. Nous exprimons également notre profonde gratitude à Madame Djarallah Maroua, pour son soutien précieux, son accompagnement scientifique de qualité, ses remarques constructives et sa collaboration sincère, qui ont considérablement enrichi cette étude et renforcé sa valeur scientifique. Nous avons également l'honneur d'adresser nos respectueux remerciements aux honorables membres du jury, qui ont bien voulu accepter d'examiner et d'évaluer ce travail. Leurs remarques scientifiques pertinentes et leur présence distinguée constituent pour nous une grande source de fierté et un encouragement précieux dans la poursuite de notre parcours académique et scientifique. Nos remerciements les plus chaleureux s'adressent également à l'ensemble des enseignants du Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Chahid Hamma Lakhdar d'El Oued, pour la qualité de leur enseignement, leur dévouement et les connaissances qu'ils nous ont transmises tout au long de notre formation universitaire. Nous exprimons enfin notre profonde reconnaissance à nos collègues, ainsi qu'à toutes les personnes qui nous ont soutenus, encouragés et accompagnés, de près ou de loin, tout au long de la réalisation de ce travail. En dernier lieu, nous prions Allah le Tout-Puissant de faire en sorte que ce travail soit utile, bénéfique et source de savoir, et qu'Il nous accorde à tous davantage de réussite et de succès.

Résumé

Cette étude vise à évaluer les propriétés chimiques et biologiques des graines de *Echinops spinosissimus*, une plante médicinale saharienne largement utilisée en médecine traditionnelle. L'étude a porté sur l'évaluation de l'activité antidiabétique, de l'activité anti-glycation, de l'activité gastroprotectrice contre l'ulcère gastrique, ainsi que sur l'analyse de l'interaction de l'extrait avec la sérum-albumine bovine (BSA). Elle a également exploré les activités antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne, ainsi que son effet stimulant sur le processus de phagocytose.

Les analyses phytochimiques ont révélé que l'extrait hydroéthanolique des graines de la plante est particulièrement riche en composés phénoliques, notamment en flavonoïdes et en tanins, connus pour leurs importantes activités biologiques.

Dans la partie expérimentale *in vitro*, l'extrait a présenté une activité inhibitrice remarquable de l'enzyme α -amylase, avec une valeur d'IC₅₀ de 0,0983 mg/mL comparativement à l'acarbose (0,1902 mg/mL), ce qui témoigne d'un potentiel inhibiteur supérieur à celui de l'acarbose, et d'une efficacité prometteuse contre l'hyperglycémie postprandiale. L'extrait a également montré une activité anti-glycation notable en réduisant la formation des produits terminaux de glycation avancée (AGEs), impliqués dans les complications du diabète. Par ailleurs, l'extrait a exercé un effet protecteur sur la muqueuse gastrique, suggérant une activité anti-ulcéreuse.

Par ailleurs, l'étude de l'interaction avec BSA, réalisée par analyse spectrophotométrique UV-Visible, a confirmé la capacité de l'extrait à se lier aux protéines biologiques. En outre, des activités antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne ont été enregistrées, accompagnées d'une stimulation marquée du processus de phagocytose et de la réponse immunitaire.

En parallèle, les études *in silico* réalisées à l'aide des logiciels AutoDock et Discovery Studio ont soutenu ces résultats. Les valeurs de docking moléculaire, de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) et de la constante de liaison (K) ont mis en évidence des interactions stables et une bonne affinité entre les constituants de l'extrait et les sites actifs des protéines et enzymes ciblées, comme en témoignent les valeurs négatives de ΔG . Ces données ont également confirmé la concordance entre les résultats computationnels et expérimentaux, notamment concernant les activités antidiabétique et anti-glycation.

Mots-clés : *Echinops spinosissimus*, , antioxydant, antidiabétique, antiglycation, anti-inflammatoire, anti-ulcéreux, interaction BSA.

Abstract

This study aimed to evaluate the chemical and biological properties of the seeds of *Echinops spinosissimus*, a Saharan medicinal plant extensively employed in traditional medicine. The investigation encompassed the assessment of antidiabetic activity, anti-glycation activity, and gastroprotective activity against gastric ulceration, in addition to characterizing the interaction of the extract with bovine serum albumin (BSA). Furthermore, the study examined the antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activities of the extract, as well as its stimulatory effect on the phagocytic process.

Phytochemical screening revealed that the hydroethanolic extract of the plant seeds is particularly enriched in phenolic compounds, predominantly flavonoids and tannins, which are well-documented for their considerable biological activities.

In the *in vitro* experimental phase, the extract demonstrated a remarkable inhibitory activity against α -amylase, yielding an IC_{50} value of 0.0983 mg/mL, which was significantly lower than that of the reference drug acarbose (0.1902 mg/mL), thereby reflecting a superior inhibitory potency and a promising therapeutic efficacy in the management of postprandial hyperglycemia. The extract also exhibited notable anti-glycation activity through the significant reduction of advanced glycation end-products (AGEs) formation, which are closely associated with the onset of diabetic complications. In addition, the extract exerted a marked protective effect on the gastric mucosa, providing evidence for potential anti-ulcer activity.

Moreover, the interaction study with BSA, performed by UV-Visible spectrophotometric analysis, confirmed the binding capacity of the extract to biological proteins, suggesting its ability to be transported through the bloodstream. Antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activities were also recorded, accompanied by a significant enhancement of the phagocytic process and immune response.

In parallel, *in silico* investigations conducted using AutoDock and Discovery Studio software provided computational support for the experimental findings. Molecular docking analyses, along with Gibbs free energy (ΔG) values and binding constant (K) determinations, revealed stable interactions and substantial binding affinity between the extract constituents and the active sites of the targeted proteins and enzymes, as further corroborated by the negative ΔG values. These computational data were in good agreement with the experimental results, particularly with respect to the antidiabetic and anti-glycation activities, thus reinforcing the therapeutic potential of the investigated extract..

Keywords: *Echinops spinosissimus*, antioxidant, antidiabetic, antiglycation, anti-inflammatory, anti-ulcer, BSA interaction,.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الخصائص الكيميائية والبيولوجية لبذور نبات *Echinops spinosissimus* ، وهو نبات طبي صحراوي يُستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي. تناولت الدراسة تقييم النشاط المضاد لداء السكري، والنشاط المضاد للغليكاسيون، والنشاط الواقي للمعدة ضد القرحة المعدية، فضلاً عن تحليل تفاعل المستخلص مع ألبومين مصل الدم البقري (BSA). كما استكشفت الدراسة الأنشطة المضادة للأكسدة والالتهاب والبكتيريا، إلى جانب تأثيرها المحفّز على عملية البلعمة.

كشفت التحليلات الكيميائية النباتية أن المستخلص الهيدروإيثانولي لبذور النبات غني بشكل خاص بالمركبات الفينولية، ولا سيما الفلافونويدات والتانينات، المعروفة بأنشطتها البيولوجية المهمة.

في الجزء التجريبي المختبري، أظهر المستخلص نشاطاً تثبيطياً ملحوظاً لإنزيم ألفا-أميلاز، بقيمة IC_{50} بلغت 0.0983 مغ/مل مقارنةً بالأكاربوز (0.1902 مغ/مل)، مما يشهد على قدرة تثبيطية فائقة للأكاربوز وفعالية واعدة في مواجهة ارتفاع السكر في الدم بعد الوجبات. كما أبدى المستخلص نشاطاً مضاداً للغليكاسيون من خلال تقليل تكوين منتجات الغليكاسيون المتقدمة النهائية (AGEs) المرتبطة بمضاعفات السكري. علاوة على ذلك، أحدث المستخلص تأثيراً وقائياً على الغشاء المخاطي المعدي، مما يُشير إلى نشاط مضاد للقرحة.

من جهة أخرى، أكدت دراسة التفاعل مع BSA ، التي أجريت بالتحليل الطيفي UV-Visible ، قدرة المستخلص على الارتباط بالبروتينات البيولوجية. كما سُجّلت أنشطة مضادة للأكسدة والالتهاب والبكتيريا، رافقها تحفيز واضح لعملية البلعمة والاستجابة المناعية.

في المقابل، دعمت الدراسات الحاسوبية المُنجزة باستخدام برنامجي AutoDock و Discovery Studio هذه النتائج. إذ كشفت قيم الإرساء الجزيئي وطاقة غيبس الحرة (ΔG) وثابت الارتباط (K) عن تفاعلات مستقرة وألفة جيدة بين مكونات المستخلص والمواقع الفعالة للبروتينات والإنزيمات المستهدفة، كما تشهد على ذلك القيم السالبة لـ ΔG . وقد أكدت هذه البيانات كذلك التوافق بين النتائج الحاسوبية والتجريبية، لا سيما فيما يتعلق بالنشاطين المضاد للسكري والمضاد للغليكاسيون.

الكلمات المفتاحية:

الكلمات المفتاحية: إكينوبس سبينوسيسيسيموس، مضاد للأكسدة، مضاد لمرض السكري، مضاد للغليكيشن، مضاد للالتهابات، مضاد للقرحة، تفاعل BSA.

Sommaire

Dédicace

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Sommaire

List de figure

List de tableau

INTRODUCTION

Première Partie

Bibliographic synthesis.

Chapter I: Echinops spinosissimus

1_ Définition d'Echinops spinosissimus:	23
2Classification botanique	23
3. Description morphologique :	23
4. Noms vernaculaires :	24
5. Répartition géographique	24
6. Composition chimique:	24
7- Études antérieures sur les usages thérapeutiques des différentes parties d'Echinops spinosissimus:	25
8. Métabolites d'Echinops spinosissimus responsables des activités biologiques :	26
9. Graines d'Echinops spinosissimus:	34
10. Pharmacocinétique:	37
11. Toxicité, effets secondaires et interactions:	37
12. Usages antidiabétiques:	38
13. Activités pharmacologiques :	38

Chapter II: Les activités biologiques de *Echinops spinosissimus*

Bacterial sensitivity.....	42
3. Activité antidiabétique :	42
6. Activité Anti-ulcéreux gastrique:.....	46

Chapitre III : Contexte théorique des techniques expérimentales

1. Techniques expérimentales	49
1.1. Spectroscopie UV-Visible	49
1.1.1 Principe de la spectroscopie UV -Visible:	49
1.2 Docking moléculaire :	50
1.2.1 Principes du docking moléculaire :	50
1.4 La base de données PubChem:	53
1.5. AutoDockTools:	55
1.6. DiscoveryStudio:	55
1.7. La Protein Data Bank (PDB) :	56
1.8. PyMOL:	57
1.9 PLIP.....	58

Deuxième partie

Chapitre I: Matériels et méthodes

Matériels et méthodes	60
I. Matériel	60
II. Méthode	61
1. Préparation de l'extrait	61
3. Tests de criblage phytochimique	62
4. Dosage des polyphénols et flavonoïdes:	64
5. Évaluation de l'activité antioxydante par spectrophotométrie UV-Visible	66
Principe :	66
6. Évaluation de l'activité antibactérienne in vitro	67

7. Évaluation de l'activité anti-diabétique.....	69
8. Activité phagocytaire	70
9. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire par le test de dénaturation de la BSA	72
10 Préparation du mucilage végétal.....	74
11. Évaluation de l'activité anti-glycation (BSA-glucose):	75
12. Évaluation de l'activité de BSA- Extrait.....	76

Chapitre II: Résultats et discussion

I. In vitro.....	86
1. Rendement d'extraction :	86
2. Criblage phytochimique	86
3. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes	88
4. Évaluation de l'activité antioxydante par la méthode UV-visible	89
5. Évaluation de l'activité antibactérienne in vitro	91
6. Évaluation de l'activité antidiabétique	95
7. Évaluation de l'activité phagocytaire.....	99
8-Évaluation de l'activité anti-inflammatoire par le test de dénaturation de la BSA:	102
9.Évaluation de l'activité anti-ulcère gastrique (modèle de barrière mucilagineuse).....	107
9.1.3. Évaluation de l'activité anti-glycation (BSA-glucose):	112
Discussion	131
Conclusion Générale	140
List of Références	Error! Bookmark not defined.

List de figure

Figure 1: Echinops spinosissimus(image réelle)	23
Figure 2:image géographique illustrant la distribution mondial d'Echinops spinosissimus.	24
Figure 3:image géographique illustrant la distribution d'Echinops spinosissimus.	24
Figure 4: 5-(but-3-én-1-ynyl)-2,2'-bithiophène	26
Figure 5:α-terthiényl	26
Figure 6: Échinopsine (1-méthyl-4-quinolone)	29
Figure 7: Échinorine.....	29
Figure 8: Acides phénoliques typiques dans les aliments : à gauche, acides benzoïques ; à droite, acides cinnamiques (Rong, 2010).	30
Figure 9: Apigenine - Oglucosideèhdg (Zitouni, 2021) R=H	30
Figure 10:Apigenine7(Zitouni2021)	31
Figure 11:Apigenine-7-O- (6"-transpcoumaroyl- β -Dglucopyranoside (Zitouni, 2021)	31
Figure 12: Structure chimique de base des isoflavones (Dias, 2021).	31
Figure 13: Structure chimique de base des flavanols (Dias, 2021).	32
Figure 14: Structure chimique de base des flavones (Dias, 2021).	32
Figure 15: Structure chimique de base des anthocyanidines (Dias, 2021).	33
Figure 16: Structure d'une chalcone (Bessam, 2015).	33
Figure 17: Graines d'Echinops spinosissimus (image réelle)	34
Figure 18: Structure chimique de la silymarine (Pferschy-Wenzig, E.-M. et al., 2023).	36
Figure 19: Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez une bactérie à Gram négatif.....	42
Figure 20: Différents médiateurs de l'inflammation (Bahi, 2015).	45
Figure 21: Page d'accueil du serveur SwissADME.....	53
Figure 22:Interface principalede la basededonnées PubChem	54
Figure 23: Page d'accueil du serveur ProTox.	54
Figure 24:Interface principale du serveur Auto Dock Tools.....	55
Figure 25: Interface principale du serveur Discovery Studio.....	56
Figure 26: Page d'accueil du serveur Protein Data Bank (PDB).	57
Figure 27: Interface du logiciel PyMOL.	57
Figure 28: Page d'accueil du serveur PLIP.	58
Figure 29Rendement de l'extraction.....	62
Figure 30: Schéma illustrant le protocole du dosage des polyphénols	65
Figure 31: Schéma illustrant le protocole d'évaluation des flavonoïdes	65

Figure 32: Schéma illustrant le protocole d'évaluation de l'activité antioxydante	67
Figure 33: Schéma illustrant le protocole d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	69
Figure 34: Schéma illustrant le protocole d'évaluation de l'activité antidiabétique	70
Figure 35: Schéma illustrant le protocole d'étude de l'activité phagocytaire.	72
Figure 36: Schéma illustrant le protocole d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire.	73
Figure 37: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	88
Figure 38: Courbe d'étalonnage de la rutine	89
Figure 39: Courbe d'étalonnage de l'extrait.....	90
Figure 40: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.....	90
Figure 41: Pourcentage d'inhibition de l'activité bactérienne par l'extrait	93
Figure 42: Taille du diamètre d'inhibition de l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i> et du témoin positif amoxicilline sur la bactérie <i>Klebsiella pseudomonas</i>	93
Figure 43: Taille du diamètre d'inhibition de l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i> et du témoin positif amoxicilline sur la bactérie <i>Enterococcus faecalis</i>	94
Figure 44: Taille du diamètre d'inhibition de l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i> et du témoin positif amoxicilline sur la bactérie <i>Staphylococcus aureus</i>	95
Figure 45: Courbe du pourcentage d'inhibition de l'activité antidiabétique par l'extrait.....	96
Figure 46: Courbe du pourcentage d'inhibition de l'activité antidiabétique par l'acarbose	97
Figure 47: Droite de $A_0 / (A - A_0)$ en fonction de $1 / [\text{Extrait}]$	98
Figure 48: Droite de $A_0 / (A - A_0)$ en fonction de $d [\text{Acarbose}]$	98
Figure 49: Pourcentage de la capacité phagocytaire de l'extrait	100
Figure 50: Courbe de l'activité phagocytaire par l'extrait	101
Figure 51: Courbe du taux d'inhibition de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait.....	103
Figure 52: Courbe du taux d'inhibition de l'activité anti inflammatoire du Diclofénac	103
Figure 53: Courbe du taux d'inhibition de l'activité anti-inflammatoire de la Prednisolone	103
Figure 54: Courbe de l'extrait phénolique d' <i>Echinops spinosissimus</i> comparée à celles du Diclofénac et de la Prednisolone	104
Figure 55: Droite de $A_0 / (A - A_0)$ en fonction de $1 / [\text{Extrait}]$	106
Figure 56: Droite de $A_0 / (A - A_0)$ en fonction de $d [\text{Diclofénac}]$	106
Figure 57: Droite de $A_0 / (A - A_0)$ en fonction de $1 / [\text{Prednisolone}]$	106
Figure 58: Courbe de protection de l'activité anti ulcère gastrique de l'extrait	109
Figure 59 : Courbe de protection de l'activité anti ulcère gastrique de alginat de Na.....	109
Figure 60: Courbe de protection de l'activité anti ulcère gastrique de l'antag.....	109
Figure 61: Courbe de protection de l'activité anti ulcère gastrique de lenzaprasole.....	109

Figure 62:presentation graphique du pourcentage de protection en fonction de different concetratation de l'extrait et alginat de Na	110
Figure 63 :presentation graphique du pourcentage de protection en fonction de different concetratation de l'extrait, antag	110
Figure 64: presentation graphique du pourcentage de protection en fonction de different concetratation de l'extrait, lanzoprazole	110
Figure 65: Étude comparative de l'activité anti-ulcéreuse de l'extrait végétal et des médicaments de référence (Lanzoprazole, Alginate de Na et Antag) contre les lésions induites par l'éthanol/HCl.	111
Figure 66:presentation graphique/courbe presente du pourcentage de protection de muqueuse gastrique en fonction de different concetratation de l'extrait, lanzoprazole lantag aligenat ...	112
Figure 67 : Courbe du taux inhibition de l'activité anti-glycation de l'extrait.....	114
Figure 68: Courbe du taux inhibition de l'activité anti-glycation du metformine.....	114
Figure 69: Courbe du taux inhibition de l'activité anti-glycation de la quercetine	114
Figure 70: Comparaison des valeurs IC50 (mg/ml) de l'extrait végétal et des molécules de référence (Metformine et Quercétine).....	115
Figure 71: Courbe de l'extrait étudiée en faisant réagir différentes concentrations de BSA.	115
Figure 72: Droite de $A_0 / (A - A_0)$ en fonction de $1 / [l'extrait]$	118
Figure 73 : Structure des diastéréoisomères de la silibine	118
Figure 74: Mode d'interaction entre le site actif de la silybine A et la cyclooxygénase-2, en représentations 2D et 3D.....	123
Figure 75: the interaction mode between the active site of silybin B and Cyclooxygenase-2, in both 2D and 3D representations	124
Figure 76Mode d'interaction entre le site actif de la silybine A et le diclofénac, en représentations 2D et 3D.....	125
Figure 77: Mode d'interaction entre le site actif de la silibine A et l'alpha-amylase, en représentations 2D et 3D.....	128
Figure 78: Représentation en 2D et en 3D du mode d'interaction entre SilybinB et l'alpha-amylase au niveau du site actif	129
Figure 79: Représentation en 2D et en 3D du mode d'interaction entre l'acarbose et l'alpha-amylase au niveau du site actif	130

List de tableau

Tableau 1:Classification taxonomique de la plante <i>Echinops spinosissimus</i>	23
Tableau 2: Composition chimique de la plante (Khamla, 2022).....	24
Tableau 3: Usages thérapeutiques des différentes parties d' <i>Echinops spinosissimus</i>	25
Tableau 4: Composition chimique des graines (BEN RAHAL, 2012).....	35
Tableau 5:Produits chimiques et réactifs	60
Tableau 6: Protocole expérimental UV-Vis	74
Tableau 7: Formats SMILES et identifiants des molécules testées et des médicaments standards.....	77
Tableau 8: Présentation de la cible 1COX2	79
Tableau 9:Docking parameters selected for cyclooxygenase-2	81
Tableau 10: Formats SMILES et identifiants des molécules testées et des médicaments standards.....	82
Tableau 11: Présentation de la cible 1OSE α -amylase	83
Tableau 12:Docking parameters selected for Alpha Amylases.....	84
Tableau 13: Rendement de l'extrait aqueux de <i>Echinops spinosissimus</i>	86
Tableau 14: Résultats des tests du criblage phytochimique.	86
Tableau 15: Équation linéaire de la courbe d'intensité d'absorbance de l'acide gallique à différentes concentrations.....	88
Tableau 16: Quantité totale de polyphénols	88
Tableau 17: Équation linéaire de l'intensité d'absorbance de la rutine à différentes concentrations.	89
Tableau 18: Quantité totale de flavonoïdes.....	89
Tableau 19: Taux d'inhibition de l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i> sur les radicaux libres en fonction de la concentration.....	90
Tableau 20: Équation lineaire de la courbe de l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i> et de l'acide ascorbique	90
Tableau 21: Valeurs de la concentration inhibitrice moyenne de l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i> et de l'acide ascorbique.....	91
Tableau 22: Résultats du test d'inhibition à différentes concentrations des espèces bactériennes testées.....	92
Tableau 23Détermination de la CI_{50}	95
Tableau 24: Résultats du taux d'inhibition de l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i> sur l'activité de l'enzyme alpha-amylase à différentes concentrations.....	95

Tableau 25: Équation exponentielle des résultats de l'évaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i> et du contrôle de référence acarbose.....	96
Tableau 26: Valeurs de la concentration inhibitrice moyenne de l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i> et de l'acarbose.....	97
Tableau 27: Rapports d'Acarbose $A_0/(A-A_0)$ et $1/C$ (M^{-1}) de l'extrait d' <i>Echinops spinosissimus</i>	97
Tableau 28: Rapports d'absorption $A_0/(A-A_0)$ et $1/C$ (M^{-1}) du Acarbose.....	97
Tableau 29: Équation de régression linéaire des résultats de l'évaluation de l'activité antidiabétique relative à l'extrait d' <i>Echinops spinosissimus</i> et à la référence standard : l'Acarbose.	98
Tableau 30 Valeurs du coefficient de liaison (K) et de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) pour l'extrait d'* <i>Echinops spinosissimus</i> *, le Acarbose	99
Tableau 31: Résultats du pourcentage de capacité phagocytaire de l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i> à différentes concentrations.....	99
Tableau 32: Équation linéaire de la courbe des résultats de la capacité phagocytaire relative à l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i>	99
Tableau 33: Valeurs de la concentration inhibitrice moyenne de l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i>	100
Tableau 34: Résultats du pourcentage de l'activité phagocytaire de l'extrait de.....	100
Tableau 35: Équation linéaire de la courbe des résultats de l'activité phagocytaire relative à l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i>	100
Tableau 36 : Valeurs de la concentration inhibitrice moyenne de l'extrait de <i>Echinops spinosissimus</i>	101
Tableau 37: Résultats du pourcentage d'inhibition de l'extrait d' <i>Echinops spinosissimus</i> relatif à l'activité anti-inflammatoire en fonction des différentes concentrations.	102
Tableau 38: Équation exponentielle des résultats de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire relative à l'extrait d' <i>Echinops spinosissimus</i> et aux références standards : l'Acarbose, le Diclofénac et la Prednisolone.	102
Tableau 39: Valeurs de la concentration inhibitrice moyenne (IC_{50}) de l'extrait d' <i>Echinops spinosissimus</i> et des références standards : Diclofénac et Prednisolone.	103
Tableau 40: Rapports d'absorption $A_0/(A-A_0)$ et $1/C$ (M^{-1}) de l'extrait d' <i>Echinops spinosissimus</i>	104
Tableau 41: Rapports d'absorption $A_0/(A-A_0)$ et $1/C$ (M^{-1}) du Diclofénac	104
Tableau 42: Rapports d'absorption $A_0/(A-A_0)$ et $1/C$ (M^{-1}) de la Prednisolone.....	105

Tableau 43: Valeurs du coefficient de liaison (K) et de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) pour l'extrait d'*Echinops spinosissimus*, le Diclofénac et la Prednisolone.....	107
Tableau 44: Résultats de l'activité biologique (en pourcentage) et la Absorbon de l'extrait d'Echinops spinosissimus comparée à différents standards (Lanzoprazole, Alginat, Antag) en fonction des concentrations	108
Tableau 45: Modélisation mathématique (équation exponentielle) et valeurs de la concentration inhibitrice médiane (IC50) de l'activité anti-ulcéreuse gastrique de l'extrait d'Echinops spinosissimus . et des substances de référence (Lansoprazole, Antag, Alginate de	109
Tableau 46: Comparaison de l'activité anti-ulcère gastrique des différents traitements (Extrait, Antag, Lanzoprazole, Alginat de sodium) en présence d'éthanol-HCl	110
Tableau 47: Résultats du inihbition protection de l'extrait à différents concentration	113
Tableau 48: Le taux d'inhibition des radicaux libres par la metformine en fonction de la concentration.	113
Tableau 49: Le taux d'inhibition des radicaux libres par la quercetine en fonction de la concentration.	113
Tableau 50: Modélisation mathématique (équation exponentielle) et valeurs de la concentration inhibitrice médiane (IC50) de l'activité anti-ulcéreuse gastrique de l'extrait d'Echinops spinosissimus L. et des substances de référence (metformine et quercétine). ...	114
Tableau 51: Résultats du pourcentage d'interaction de l'extrait d'Echinops spinosissimus avec la BSA en fonction des différentes concentrations.	116
Tableau 52: Modélisation mathématique (équation exponentielle) et valeurs de la concentration inhibitrice médiane (IC50) de l'activité anti-ulcéreuse gastrique de l'extrait d'Echinops spinosissimus	116
Tableau 53: Équation exponentielle des résultats.....	116
Tableau 54: Résultats de l'inverse de la concentration (1/c) et de la réponse spectrophotométrique (A/A_0-A).	117
Tableau 55: Équation de la régression linéaire pour la détermination des paramètres de liaison	117
Tableau 56: Valeurs du coefficient de liaison (K) et de l'énergie libre de Gibbs (ΔG).	118
Tableau 57: Propriétés physicochimiques des extraits végétaux et du diclofénac (SwissADME).	119
Tableau 58: Détails des différentes règles de « drug-likeness » et de biodisponibilité pour l'extrait de plante (SwissADME)	119

Tableau 59: Résultats des paramètres pharmacocinétiques de l'extrait végétal étudié et du médicament (SwissADME).....	120
Tableau 60: Prédiction de la toxicité des plantes et des médicaments (ProTox).	121
Tableau 61: Différentes valeurs de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) de l'interaction de l'extrait végétal avec la cyclooxygénase-2 obtenues par docking.....	122
Tableau 62 : Liaisons au site d'interaction de la silybine A avec la cyclooxygénase-2 (PLIP).	124
Tableau 63: Liaisons au site d'interaction de la silybine B avec la cyclooxygénase-2 (PLIP).	125
Tableau 64: Liaisons au site d'interaction du diclofénac avec la cyclooxygénase-2 (PLIP).	126
Tableau 65: Comparaison des résultats in silico et in vitro de K et ΔG	126
Tableau 66: Prédiction de la toxicité des plantes et des médicaments (ProTox).	127
Tableau 67 : Liaisons au site d'interaction de la silybine A avec l'alpha-amylase.....	128
Tableau 68: Liaisons au site d'interaction de la silybine B avec l'alpha-amylase.....	129
Tableau 69: Liaisons au site d'interaction de l'acarbose avec l'alpha-amylase.....	130
Tableau 70 : Comparaison des résultats in silico et in vitro de K et ΔG	131

INTRODUCTION

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'Antiquité pour la prévention et le traitement des maladies humaines. Leur efficacité thérapeutique est principalement attribuée à la présence d'une grande diversité de composés naturels bioactifs, appelés métabolites secondaires. Ces composés sont synthétisés et accumulés dans différents tissus végétaux et parfois au sein de types cellulaires hautement spécialisés.

Face aux défis contemporains liés à l'émergence de la résistance microbienne aux antibiotiques, ainsi qu'à la toxicité potentielle des antioxydants synthétiques, l'intérêt scientifique pour le règne végétal s'est intensifié. Les plantes médicinales et alimentaires sont ainsi explorées comme sources de molécules naturelles efficaces, présentant peu ou pas d'effets secondaires. De nombreuses études ont mis en évidence une large variété de métabolites secondaires dotés d'activités biologiques importantes, tels que les polyphénols, les tanins, les alcaloïdes, les flavonoïdes et les terpènes (Gheffour, 2019).

Les investigations phytochimiques menées sur l'espèce *Echinops spinosissimus* ont révélé une richesse importante en composés bioactifs, notamment les thiophènes, les terpénoïdes, les stérols, les acides gras et les alcanes. Cette diversité moléculaire a valu à cette plante l'appellation de « pharmacie complète », en raison de son efficacité dans le traitement de diverses pathologies telles que les infections, les parasitoses intestinales, les hémorroïdes, les migraines, la diarrhée et les affections cardiaques. Elle présente également une activité antimicrobienne notable contre différents agents pathogènes, y compris des souches bactériennes à Gram positif et à Gram négatif, notamment résistantes aux antibiotiques, ce qui en fait une candidate prometteuse pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques (Al Masoudi et al., 2023).

Sur le plan traditionnel, les espèces du genre *Echinops* sont utilisées dans le traitement de plusieurs maladies infectieuses, notamment la septicémie, le trachome, la gonorrhée et la fièvre typhoïde. Elles sont également employées contre les troubles respiratoires, les états fébriles et diverses douleurs. Plusieurs études ont confirmé leur activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Parallèlement, *Echinops spinosissimus* suscite un intérêt croissant dans la prise en charge du diabète. Les recherches ont montré que les plantes riches en composés phénoliques constituent des sources importantes de molécules capables d'intervenir dans les processus physiopathologiques liés aux troubles du métabolisme glucidique. Cette activité est principalement liée à la capacité de ces composés à inhiber des enzymes digestives clés, permettant ainsi de réduire l'hyperglycémie postprandiale (Benrahou et al., 2022).

Introduction

Echinops spinosissimus est largement distribué dans le bassin méditerranéen et en Afrique du Nord. Bien que la majorité des travaux scientifiques se soient concentrés sur les parties aériennes de la plante, les graines restent peu étudiées. D'un point de vue biologique, elles constituent des réservoirs de nutriments essentiels et concentrent souvent des métabolites secondaires impliqués dans la protection de l'embryon, leur conférant ainsi un potentiel prometteur en tant qu'agents antioxydants et antidiabétiques.

Dans ce contexte, les graines de *Echinops spinosissimus* ont été sélectionnées dans la présente étude afin de caractériser leurs propriétés chimiques et biologiques et d'évaluer leur potentiel pharmacologique à travers des approches *in vitro* et *in silico*. Ce choix se justifie par leur richesse supposée en composés bioactifs et par la rareté des données scientifiques les concernant, conférant à ce travail un caractère innovant.

Cette étude vise à évaluer les propriétés biologiques de l'extrait des graines de *Echinops spinosissimus* à travers une approche multidisciplinaire. L'activité antioxydante ainsi que l'activité antidiabétique ont été évaluées.

L'activité anti-inflammatoire a été étudiée par la méthode de dénaturation des protéines, tandis que le potentiel anti-ulcéreux a été exploré afin d'évaluer l'effet protecteur de l'extrait. L'activité immunomodulatrice a été examinée par un test de phagocytose. L'interaction moléculaire entre l'extrait et l'albumine sérique bovine (BSA) a été analysée par spectrophotométrie UV-Visible. L'activité antibactérienne a également été évaluée contre différentes souches bactériennes à Gram positif et à Gram négatif. Ces travaux ont été complétés par une étude *in silico* (docking moléculaire via AutoDock et analyse ADME via SwissADME) afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués.

Notre mémoire est structure comme suit:

Étude bibliographique divisé en trois chapitres:

Chapitre I : Généralités sur l'espèce *Echinops spinosissimus*

Chapitre II : Activités biologiques et potentiel pharmacologique de la plante

Chapitre III : Fondements théoriques des techniques expérimentales utilisées

En revanche la deuxième partie concerne l' Étude expérimentale comprend deux chapitres

Chapitre I contient le Matériels et méthodes suivi par le Chapitre II qui présente les Résultats et discussion, en fin une conclusion général avec les perspectives viennent terminer notre travail

Première Partie

Bibliographic synthesis.

Chapter I

Echinops spinosissimus

1_Définition d'Echinops spinosissimus:

Le genre Echinops, appartenant à la famille des Asteraceae (anciennement Compositae), comprend environ 120 espèces réparties dans la région méditerranéenne, en Asie centrale et en Afrique tropicale. En Algérie, ce genre est représenté par l'espèce largement répandue *Echinops spinosus* L. (Boudersa, 2022).

2Classification botanique

3. Description morphologique :

Tableau 1:Classification taxonomique de la plante *Echinops spinosissimus*.

Classification	Nom	
Règne	Plantae	
Embranchement	Streptophyta	
Classe	Equisetopsida	
Sous-classe	Magnoliidae	
Order	Asterales	
Famille	Asteraceae	
Genre	Echinops	
Espèce	<i>Echinops spinosissimus</i>	

Figure 1: *Echinops spinosissimus*(image réelle)

Cette plante herbacée vivace peut atteindre plus d'un mètre de hauteur. Elle présente des tiges dressées, de couleur brun rougeâtre, ainsi que des feuilles espacées, allongées (10–15 cm), velues et à texture évoquant une toile d'araignée. Sa caractéristique la plus remarquable est l'abondance de très longues épines.

La plante produit un capitule unique, arrondi, pouvant atteindre 5 cm de diamètre, également entouré de nombreuses longues épines. Ce capitule dense renferme de petites fleurs bisexuées de forme tubulaire, dont la couleur évolue du vert au blanc, puis au jaunâtre à

maturité. Les fruits, de petite taille, sont des akènes munis d'écailles membraneuses favorisant leur dispersion par le vent (Ghina, 2024).

4. Noms vernaculaires :

En Algérie, *Echinops spinosus* L. possède plusieurs appellations vernaculaires. En berbère, elle est connue sous les noms de « Taskra », « Teskera », « Taskra Ameskelit T » et « Sarsor ».

En arabe, elle est désignée par « fougla el djemel », « chouk el djemel », « souk ej-jmal », « Kachir », « Ikchir », « Chouk el Hamir », « Chicaou » et « Sorr ».

En langue, elle est appelée « Téfariast »

5. Répartition géographique

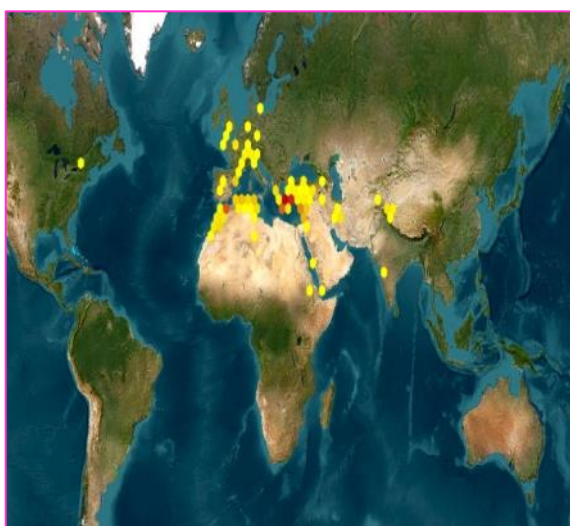


Figure 2: image géographique illustrant la distribution mondiale d'*Echinops spinosissimus*.

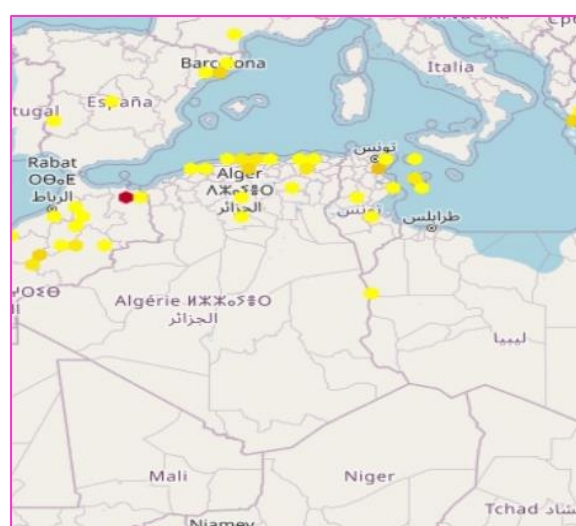


Figure 3: image géographique illustrant la distribution d'*Echinops spinosissimus*.

6. Composition chimique:

Les analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ont permis d'identifier plusieurs composés bioactifs dans les extraits, notamment l'acide protocatéchique, l'acide gallique, la rutine, l'acide vanillique, la quercétine, le kaempférol, l'acide hexadécanoïque, l'acide stéarique, l'acide oléique et l'acide linoléique (Masoudi, 2023).

Tableau 2: Composition chimique de la plante (Khamla, 2022)

Type	Composant/Constituant	Proportion/Activité Biologique
Protéines	Albumine	Représentent environ 25-30% du poids total des graines
Acid gras	Poids total	Représentent environ 15-30% du poids total des graines .
Acid gras	Acid linoléique	%60
Acid gras	Acid oléique	%30
Acid gras	Acid palmitique	%9
Tocophérol	α -tocophérol	%0.038
Sucres	Arabinose, Rhamnose, Xylose, Glucose	Présence sous forme de traces
Flavonoïdes	Quercétol- Taxifolin Eriodictyol- Chrysoériol-Naringine - Dihydrokaempférol -Kaempférol - Apigénol – Naringénine	Forte inhibition de α -amylase :86,55%

7- Études antérieures sur les usages thérapeutiques des différentes parties d'*Echinops spinosissimus*:

Tableau 3: Usages thérapeutiques des différentes parties d'*Echinops spinosissimus*.

Parties utilisées	Usages thérapeutiques	Pays	Référence
Racine	Affection hypolycémiques diurèse, sois post-partu ,troubles hépatique, stimulation de l'appétit, dépuratation ,application ,obstétricales.	Maroc	(Bouzabata,2018)
Racine	Infection génitales (post-avortement), infection des voies urinaire ,inflammation .	Algérie (Mascara)	(Bouzabata,2018)
Branches et fleurs	Décoction :traitement des calculs rénaux,désinfectant ,diurétique,hypoglycémiant ,abortif ,induction des contraction utérines lors de l'accouchement . Infusion:soulagement des névralgies et de la fatigue.	Maroc	(Zitouni, 2021)

Graines	Remède antidiabétique	Maroc	(Bouzabata ,2018)
Tiges et feuilles	Effets hépatoprotecteurs, usages abortifs	Maroc	(Zitouni, 2021)
Plante entière	Troubles rénaux Troubles spléniques Troubles hépatiques Troubles de la vésicule biliaire	Maroc	(Marceddu ,2022)

8. Métabolites d'*Echinops spinosissimus* responsables des activités biologiques :

L'analyse phytochimique des espèces du genre *Echinops* a révélé une prédominance des thiophènes et des terpènes. Les racines constituent la principale source de thiophènes, tandis que les parties aériennes contiennent des concentrations plus élevées de terpènes et de flavonoïdes. D'autres composés, notamment les flavonoïdes, les composés phénoliques, les alcaloïdes, les lipides et les phénylpropanoïdes, ont également été identifiés. Les huiles essentielles sont largement distribuées dans la plante et environ 53 composés isolés présentent diverses activités biologiques (Bitew, 2019).

8.1. Thiophènes:

Le genre *Echinops* renferme une variété de thiophènes biologiquement actifs, produits par la combinaison d'acides gras et de soufre réduit. Ces composés, caractérisés par des groupes fonctionnels acétyléniques et généralement deux noyaux thiophéniques, ont été identifiés chez neuf espèces d'*Echinops*. Parmi eux, le 5-(4-hydroxybut-1-ynyl)-2-(pent-1,3-diynyl)-thiophène est particulièrement représentatif (Zitouni, 2021).

Certains thiophènes présentent plusieurs activités pharmacologiques, notamment antipaludéenne, insecticide et fongicide (Ghina, 2024).

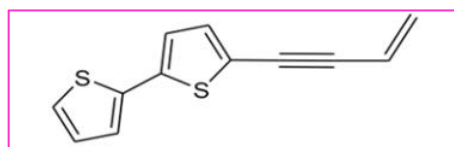


Figure 4: 5-(but-3-én-1-ynyl)-2,2'-bithiophène

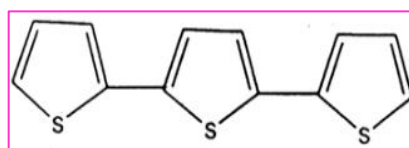


Figure 5: α -terthiényl

8.2. Terpénoïdes:

Les sesquiterpénoïdes et les triterpénoïdes sont des composés chimiques présents principalement dans la plante entière et dans les parties aériennes du genre *Echinops*. La majorité des sesquiterpénoïdes contiennent des lactones, qui constituent les métabolites secondaires les plus courants dans la famille des Asteraceae.

Les triterpénoïdes existent sous différentes formes telles que les lactones, les esters, les stérols et les glycosides. Les sesquiterpénoïdes les plus fréquemment rapportés sont la costunolide, le lupéol et l'acétate de lupéol (Ghina, 2024)

8.2.1. Monoterpène

Les monoterpènes constituent un groupe diversifié comprenant plus de 900 composés chimiques. Ils sont classés selon leur structure en composés linéaires (acycliques), monocycliques ou bicycliques. Ils sont formés par l'assemblage « tête-à-queue » d'unités isopréniques.

Monoterpènes acycliques:

Ce sont des composés à structure linéaire dérivés du géranyl pyrophosphate (GPP), premier produit issu du mévalonate dans les voies biochimiques. Parmi ces monoterpènes acycliques, le géraniol est le plus répandu dans les plantes (Malecky, 2008).

Monoterpènes monocycliques:

Caractérisés par une structure à un seul cycle, ils dérivent du néryl pyrophosphate (NPP) ou du géranyl pyrophosphate (GPP). Les composés aromatiques tels que le p-cymène et ses dérivés hydroxylés sont prédominants dans ce groupe, souvent associés au γ -terpinène.

Cette catégorie comprend quatre sous-groupes :

- ✓ Hydrocarbures $C_{10}H_{16}$ à deux doubles liaisons (ex. D-limonène, phellandrènes).
- ✓ Hydrocarbures $C_{10}H_{18}$ à une double liaison.
- ✓ Hydrocarbures saturés $C_{10}H_{20}$ (menthanes) dont les dérivés alcool (menthol) et cétone (menthone) existent naturellement.
- ✓ Hydrocarbures $C_{10}H_{20}$ contenant un oxyde (ex. cinéole/eucalyptol), abondants (Malecky, 2008).

Monoterpènes bicycliques:

Caractérisés par une structure à deux cycles, ils sont abondants dans de nombreuses huiles essentielles. Ils sont particulièrement abondants dans les huiles essentielles, notamment celles issues des conifères. Ils sont principalement classés dans les familles du pinane, du bornane et du thujane, tandis que les familles du fenchane et du carane sont moins fréquentes (Malecky, 2008).

8.2.2. Sesquiterpènes:

Les sesquiterpènes, constitués de trois unités isopréniques ($C_{15}H_{24}$), représentent la classe la plus diversifiée des terpènes. Ils peuvent être acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques ou polycycliques. Ils existent sous forme d'hydrocarbures ou de dérivés oxygénés tels que les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones (El Haib, 2011). La plante *Echinops spinosus* est riche en sesquiterpènes, principalement en raison de la présence d'échinopsine A et B. Un nouveau sesquiterpénoïde, le 11-hydroxyisocom-2-en-5-one (S41), a été identifié dans l'extrait racinaire au dichlorométhane d'une sous-espèce d'*Echinops spinosissimus* (Bouzabata, 2018).

8.2.3. Diterpènes:

Les diterpènes sont des composés C_{20} formés de quatre unités isopréniques, dérivés du géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP). Ils se trouvent principalement dans les résines végétales, les gibbérellines et certains champignons. La plupart des diterpènes sont cycliques, tandis que les formes linéaires, comme le phytol (composant de la chlorophylle et des vitamines K et E), appartiennent à la famille des phytanes. Les diterpènes cycliques sont fondés sur une structure cyclophytane (Malecky, 2008).

8.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes quinoléiniques des espèces du genre *Echinops* dérivent de l'acide anthranilique, métabolite du tryptophane. Ces composés possèdent une structure bicyclique. Le sous-groupe des furoquinoléines, tel que la furacridone, contient un cycle furane supplémentaire. Connus pour leurs propriétés médicinales, ces alcaloïdes ont inspiré le développement de médicaments quinoléiniques synthétiques (Enas J. Khadim et al., 2014). En 2011, l'échinopsine — un alcaloïde quinoléinique naturel — a été isolée des capitules floraux d'*Echinops spinosus* L. dans une étude égyptienne (Zitouni, 2021).

- ✓ Cette substance alcaline ne présente pas de fluorescence sous la lumière. Ses sels dissous réagissent avec les réactifs classiques de détection des alcaloïdes en formant un précipité solide. Elle possède un goût très amer et ses effets physiologiques sont similaires, mais plus faibles, que ceux d'une combinaison de brucine et de strychnine.

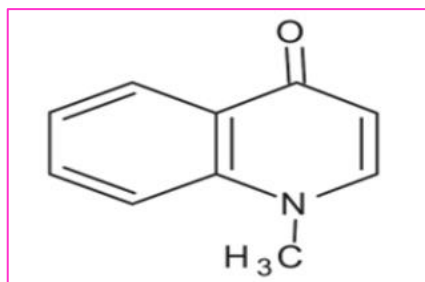


Figure 6: Échinopsine (1-méthyl-4-quinolone)

- ✓ L'échinorine est une substance chimique dont la structure a été identifiée comme étant le 1-méthyl-4-méthoxyquinolinium. Lorsqu'elle est dissoute dans un milieu basique (alcalin), elle se transforme en un autre composé appelé *échinopsine*, dont le nom chimique est 1-méthyl-quinolinone-4.

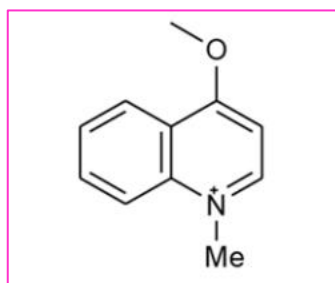


Figure 7: Échinorine.

8.4. Flavonoïdes et autres composés phénoliques:

8.4.1. Acides phénoliques:

Les acides phénoliques sont des polyphénols non flavonoïdiques. Ils sont divisés en deux groupes principaux :

- * Les dérivés de l'acide benzoïque (un atome de carbone lié à un noyau aromatique à six carbones)
- * Les dérivés de l'acide cinnamique (chaîne à trois carbones liée à un noyau aromatique à six carbones)

Ils sont présents sous forme libre dans de nombreux fruits et légumes. Dans les céréales et les graines (notamment dans les couches externes), ils sont souvent liés à d'autres molécules et nécessitent une hydrolyse acide, basique ou enzymatique pour être libérés (Rong, 2010).

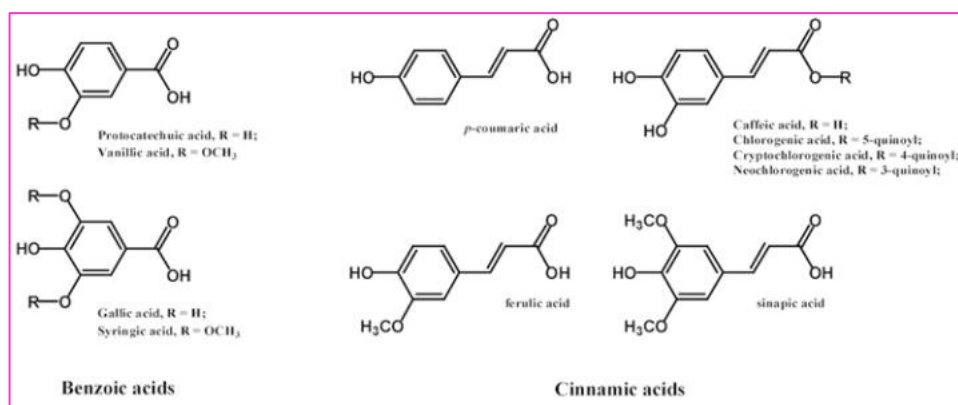


Figure 8: Acides phénoliques typiques dans les aliments : à gauche, acides benzoïques ; à droite, acides cinnamiques (Rong, 2010).

8.4.2. Flavonoïdes:

Les flavonoïdes des plantes du genre *Echinops*, en particulier les flavones telles que l'apigénine, présentent d'importants bénéfices médicinaux. Principalement localisés dans les parties aériennes et les fleurs, ils agissent comme de puissants antioxydants et possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, antibactériennes et antifongiques. Ils contribuent à la protection de la muqueuse gastrique et peuvent participer à la prévention du cancer en modulant divers processus cellulaires (Ghina, 2024).

Echinops spinosus contient trois flavonoïdes identifiés : l'apigénine, l'apigénine-7-O- β -glucopyranoside et l'apigénine-7- β -D-O-(6''-O-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside. Cette étude constitue la première à signaler la présence de ces composés spécifiques dans cette espèce végétale (Boumaraf, 2016).

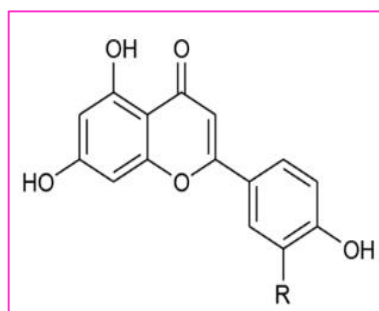


Figure 9: Apigenine - Oglucoside (Zitouni, 2021) R=H

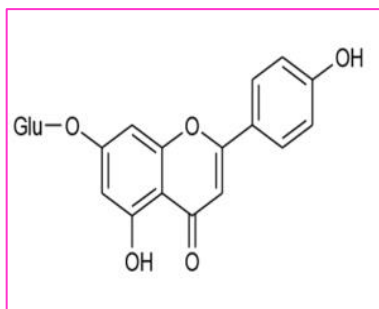


Figure 10: Apigenine7(Zitouni2021)

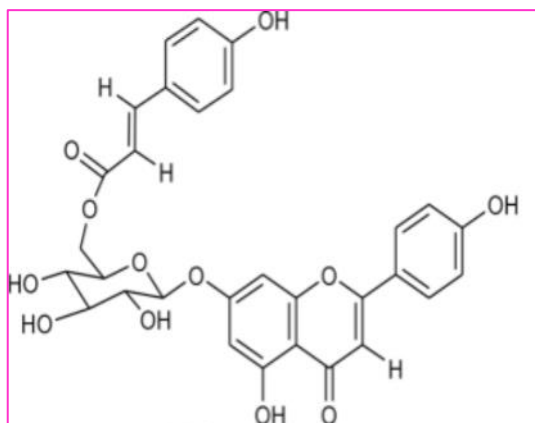


Figure 11: Apigenine-7-O- (6''-transp-coumaroyl- β -Dglucopyranoside (Zitouni, 2021)

8.4.2.1. Isoflavones:

Les isoflavones constituent une classe de flavonoïdes caractérisée par un groupe phényle attaché au troisième atome de carbone de la structure chromén-4-one. Ce groupe phényle en position C-3 les distingue des flavones, où le groupe phényle est attaché au deuxième atome de carbone. Malgré cette différence de position du groupe phényle, les isoflavones et les flavones possèdent des structures chimiques très similaires et sont considérées comme des isomères (Rong, 2010).

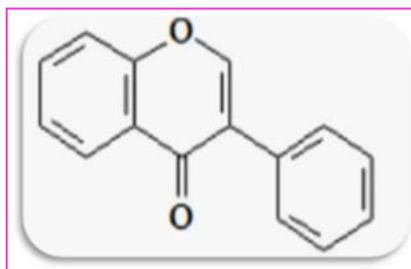


Figure 12: Structure chimique de base des isoflavones (Dias, 2021).

8.4.2.2. Flavanols:

Les flavanols, ou flavan-3-ols/catéchine, sont des composés courants dans les plantes comestibles, la catéchine et l'épicatéchine étant les formes les plus répandues. Ces flavanols

peuvent se polymériser en proanthocyanidines (tanins condensés), nom dérivé de leur capacité à être décomposés en anthocyanidines par traitement acide (SAIDI, 2019).

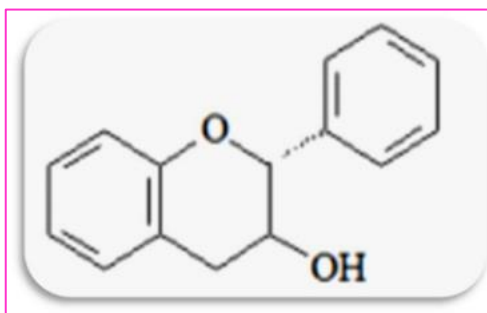


Figure 13: Structure chimique de base des flavanols (Dias, 2021).

8.4.2.3. Flavones:

Lorsqu'une double liaison est présente entre les atomes de carbone C2 et C3 dans la structure des flavanones, la molécule est classée comme flavone, dérivé du 2-phénylchromén-4-one (Bessam, 2015).

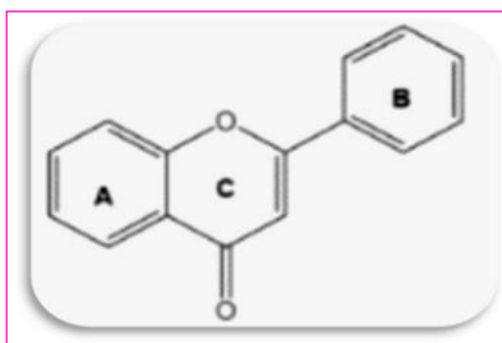


Figure 14: Structure chimique de base des flavones (Dias, 2021).

8.4.2.4. Flavanones et Hydroflavonols:

Les flavanones et les hydroflavonols sont des composés apparentés qui diffèrent des flavones et des flavonols par l'absence de double liaison entre les carbones C2 et C3 et par la présence d'une asymétrie structurale.

Les dihydroflavonols constituent un sous-groupe des flavanones caractérisé par un groupement hydroxyle supplémentaire en position C3 (Akroum, 2011).

8.4.2.5. Anthocyanidines:

Les anthocyanidines sont des flavonoïdes chargés responsables des colorations rouge, violette et bleue dans la nature, jouant un rôle essentiel dans l'attraction des pollinisateurs (Rong, 2010).

Les anthocyanines correspondent aux anthocyanidines liées à une molécule de sucre au niveau du groupement hydroxyle en position C3 par une liaison hétérosidique. Parmi les

exemples figurent la pélargonidol-3,4-O-glucoside et la cyanidol-3-O-rutinoside (kéracyanine) (Akroum, 2011).

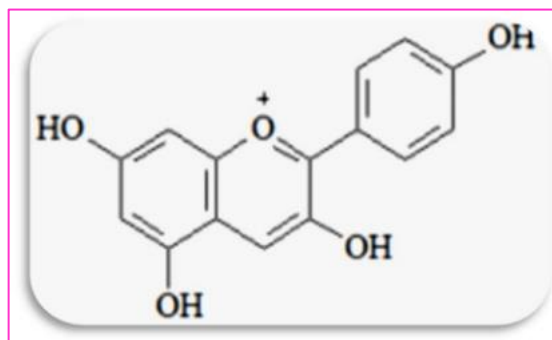


Figure 15: Structure chimique de base des anthocyanidines (Dias, 2021).

8.4.2.6. Chalcones et Aurones:

Les chalcones possèdent un cycle central ouvert composé de deux noyaux aromatiques reliés par une chaîne cétonique insaturée à trois atomes de carbone. Leur cycle B est souvent non substitué, tandis que le cycle A comporte des substituants comme les autres flavonoïdes. Les aurones présentent une structure de type 2-benzylidène coumaranone. Certains auteurs classent les anthocyanines parmi les flavonoïdes en raison de leurs similarités structurales, notamment avec les anthocyanidines (Akroum, 2011).

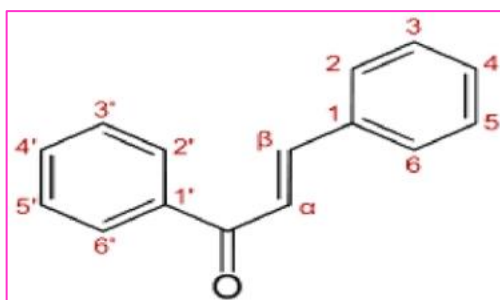


Figure 16: Structure d'une chalcone (Bessam, 2015).

8.4.3. Tanin:

Les tanins sont des composés phénoliques courants chez les Angiospermes, les Gymnospermes et les Dicotylédones. Ils ont la capacité de se lier aux protéines et de les précipiter, la force de cette interaction variant selon la nature de la protéine (Akroum, 2011).

8.5. Huiles essentielles et lipides:

Le genre *Echinops* est riche en constituants bioactifs des huiles essentielles, principalement localisés dans les racines (Bitew et Hymete, 2019). Le composé prédominant est l'isohyobunone (152), suivi du modephène (157), de l'isocomène (150), du β -phellandrène (164), de l' α -pinène (165), de la déhydrocostuslactone (140), du β -pinène (166) et du β -isocomène (151) (Elseragy, 2024).

9. Graines d'*Echinops spinosissimus*:

9.1. Définition des graines:

Les fruits, plus précisément les akènes, se caractérisent par un long pappus blanc et présentent une coloration variant du noir au brun brillant, avec des formes grisâtres tachetées fréquemment observées. Le poids de mille graines varie entre 20 et 30 grammes. Le nombre de graines par capitule varie approximativement de 65–100 à environ 190 graines, selon le génotype et les conditions de croissance, ce qui peut représenter plus de 6000 graines par plante (Roberto, 2022)



Figure 17: Graines d'*Echinops spinosissimus* (image réelle)

9.2. Composition chimique des graines:

Les graines de *Echinops spinosissimus* contiennent des composés végétaux actifs tels que des terpénoïdes et des thiophènes, contribuant à l'activité biologique de la plante, bien que les études détaillées sur leur composition chimique complète restent limitées. En revanche, les graines de chardon-Marie (*Silybum marianum*) sont riches en silymarine, un composé actif extrait des graines et représentant entre 4 et 6 %, ainsi qu'une teneur élevée en lipides, protéines et antioxydants tels que la vitamine E et les flavonoïdes, ce qui les distingue des graines d'*Echinops spinosissimus* en termes de composition et d'applications médicales. Il est donc essentiel de distinguer ces deux espèces en raison de la différence dans la composition de leurs graines et leurs composés actifs, influençant leurs propriétés biologiques ainsi que leurs usages industriels et médicaux.

Tableau 4: Composition chimique des graines (BEN RAHAL, 2012)

Type	Pourcentage
Silymarine	%6-4
Lipides	%30-20
Protéines	%30-25
Minéraux	-
Calcium	-
Phosphore	0.6g/kg
Vitamin E	60-50mg/100g
Flavonoïds	%0.25
Acidesgras insaturés	%56polyinsaturés, %21 ,mono-insaturés

9.2.1. Silymarine:

La silymarine, extraite du chardon-Marie (*Silybum marianum*), est un mélange phytochimique complexe composé principalement de flavonolignanes, de flavonoïdes (taxifoline, quercétine) et de composés polyphénoliques. Ces molécules présentent une activité antioxydante marquée ainsi que diverses propriétés biologiques. Les principaux isomères flavonolignaniques constituant la silymarine sont la silibinine, l'isosilibinine, la silicristine et la silidianine, la silibinine (également appelée silybine) étant le constituant le plus abondant et le plus actif sur le plan biologique. La silibinine représente environ 50–60 % du complexe de silymarine, tandis que les autres flavonolignanes constituent approximativement 35 %, répartis comme suit : la silicristine (~20 %), la silidianine (~10 %) et l'isosilibinine (~5 %). La silibinine, flavonoïde polyphénolique doté d'une activité antioxydante, possède la formule moléculaire $C_{25}H_{22}O_{10}$ et une masse moléculaire de 482,44 g/mol. Elle existe elle-même sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, la silibinine A et la silibinine B, présents dans un rapport approximativement équimolaire (Gillissen, 2020)

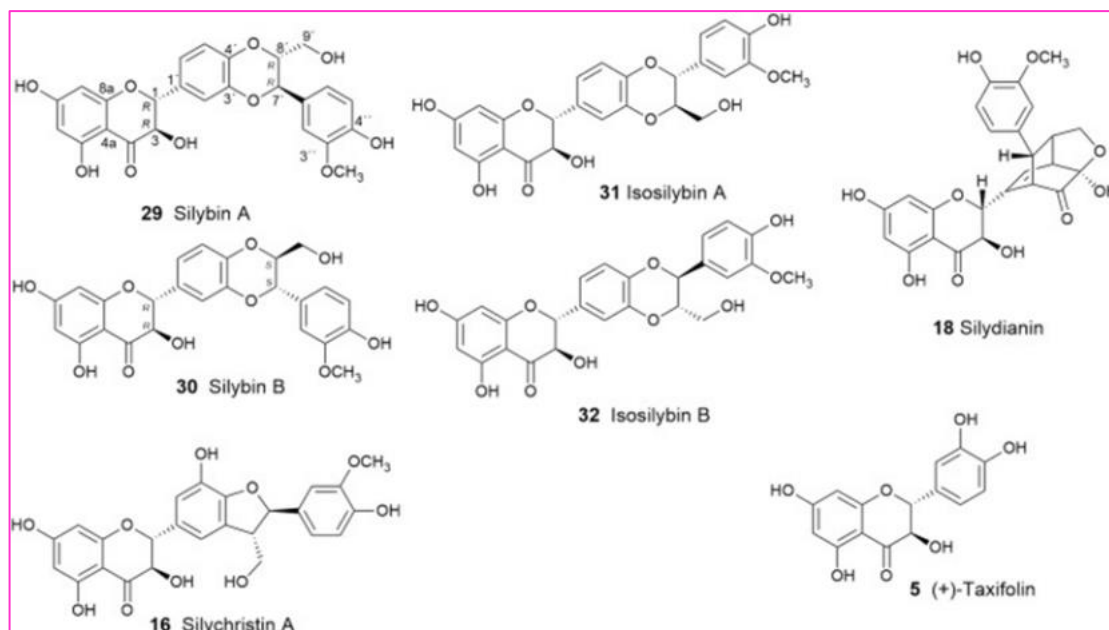


Figure 18: Structure chimique de la silymarine (Pferschy-Wenzig, E.-M. et al., 2023).

9.2.1.1. Mode d'action de la silymarine:

Le chardon-Marie contribue au maintien de la santé hépatique et à l'amélioration des fonctions du foie, principalement en neutralisant des substances nocives telles que les leucotriènes et les radicaux libres susceptibles d'endommager les cellules hépatiques.

La silymarine, principe actif majeur du chardon-Marie, exerce ses effets hépatoprotecteurs par plusieurs mécanismes :

1. Elle inhibe la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres.
2. Elle favorise la régénération des hépatocytes en stimulant la synthèse protéique.
3. Elle améliore la capacité du foie à éliminer les toxines en influençant la phase I des processus de détoxification.
4. Elle optimise le métabolisme hépatique de diverses substances et prévient la diminution du glutathion, composé protecteur essentiel.
5. Elle exerce un effet anti-inflammatoire en inhibant la production de certaines molécules pro-inflammatoires et en modulant l'activité de cellules immunitaires spécifiques du foie.
6. Elle peut ralentir, voire inverser, la fibrose hépatique en empêchant la transformation de certaines cellules hépatiques en tissu cicatriciel.
7. Elle pourrait présenter un potentiel anticancéreux en interférant avec la prolifération des cellules tumorales.

8. Elle est également susceptible de moduler la réponse immunitaire dans le contexte d'une pathologie hépatique (Bouhalit, 2018)

10. Pharmacocinétique:

L'absorption orale (biodisponibilité) de la silybine, molécule clé dans les études pharmacocinétiques, est généralement faible et dépend de la composition ainsi que de la concentration de l'extrait de silymarine. Cette faible biodisponibilité peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment sa faible solubilité dans l'eau, son métabolisme hépatique important et son élimination rapide de l'organisme. La faible absorption peut être significativement améliorée par la formation d'un complexe avec la phosphatidylcholine ou par son incorporation dans des systèmes spécialisés d'administration des médicaments, tels que les SMEDDS® (Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems) ou les liposomes, permettant d'augmenter l'absorption de deux à trois fois. La concentration plasmatique de la silymarine reflète son absorption intestinale. Chez les sujets sains, seulement 23 à 47 % de la silymarine ingérée est absorbée, atteignant des concentrations plasmatiques maximales en 2 à 9 heures, avec une demi-vie d'environ 6 heures. La principale voie d'élimination est biliaire (20 à 40 % sous forme conjuguée) sur une période supérieure à 24 heures, avec une excrétion mineure par voie urinaire (3 à 8 %), le reste étant éliminé dans les fèces (Bouhalit, 2018).

11. Toxicité, effets secondaires et interactions:

Le chardon-Marie est considéré comme une plante sûre d'utilisation, présentant un faible risque de toxicité, même à doses élevées. Bien que les méthodes d'évaluation de ses effets ne soient pas toujours clairement décrites, certains individus peuvent présenter de légers troubles digestifs, notamment un effet laxatif, et de rares réactions allergiques ont été rapportées. Une augmentation transitoire des enzymes hépatiques et des acides biliaires peut également être observée au début du traitement par le chardon-Marie. Des études portant sur la toxicité aiguë de la silymarine administrée par voie intraveineuse ont été réalisées chez plusieurs espèces animales. La dose létale médiane (DL50) variait selon l'espèce : 400 mg/kg de poids corporel chez la souris, 385 mg/kg chez le rat, 140 mg/kg chez le chien et le lapin. Cette dose létale était plus élevée lorsque la perfusion était administrée lentement sur une période prolongée (2–3 heures) chez le rat (2 g/kg), et considérablement plus élevée lors d'une administration orale (10 g/kg). D'autres études utilisant une forme spécifique de silymarine administrée par voie intraveineuse ont également montré des variations des doses létales selon les espèces animales. Globalement, ces travaux indiquent que le chardon-Marie et ses composants présentent un très faible niveau de toxicité aiguë, subaiguë et chronique (Bouhalit, 2018).

12. Usages antidiabétiques:

L'extrait de chardon-Marie, riche en silymarine, suscite un intérêt croissant dans la prise en charge du diabète en raison de ses effets potentiels sur l'amélioration de la régulation de la glycémie et le maintien de l'homéostasie glucidique. Ce produit naturel est considéré comme un complément prometteur dans les approches thérapeutiques adjuvantes, notamment en association avec les traitements conventionnels. Des études suggèrent que la silymarine pourrait contribuer à l'amélioration du contrôle glycémique et à la réduction de certaines altérations métaboliques associées au diabète (Křen & Walterová, 2005).

13. Activités pharmacologiques :

Echinops spinosissimus contient des composés bioactifs (thiophènes, terpènes, etc.) et a été traditionnellement utilisé comme remède à large spectre contre les infections, les parasites, les douleurs et les troubles digestifs. Les recherches actuelles se concentrent sur son potentiel antimicrobien face aux microbes résistants aux médicaments, en explorant à la fois des composés naturels et des médicaments synthétiques. Le genre *Echinops* possède une histoire d'utilisation dans le traitement de diverses maladies infectieuses ainsi que d'affections bactériennes et fongiques. Des études confirment l'activité antimicrobienne d'*Echinops* contre différentes bactéries. De plus, *E. spinosissimus* contient des antioxydants (phénoliques et flavonoïdes) capables de combattre le stress oxydatif, un problème majeur de santé.(Masoudi, 2023).

Chapter II

Les Activités Biologiques de *Echinops spinosissimus*

1. Activité antioxydante

1.1. Stress oxydatif

1.1.1. Définition du stress

oxydatifLe stress oxydatif décrit un état dans lequel l'équilibre physiologique entre la production de molécules instables (radicaux libres) et les systèmes de défense de l'organisme (antioxydants) est rompu, au profit d'une prédominance des radicaux libres. Cette situation peut survenir lorsque les niveaux d'antioxydants sont insuffisants ou lorsque la production de radicaux libres est excessive. (Gupta, 2015)

1.2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes, molécules ou ions) caractérisées par la présence d'au moins un électron non apparié. Cette configuration électronique instable les rend hautement réactifs, capables de céder ou de capter un électron à partir d'autres molécules. Par conséquent, ils peuvent agir à la fois comme agents oxydants et réducteurs dans les réactions chimiques. (FERDJIOUI, 2020)

1.2.1. Nature des radicaux libres

Espèces réactives de l'oxygène (ERO) :

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) constituent un groupe de molécules hautement réactives contenant de l'oxygène. Cette catégorie comprend des radicaux dérivés de l'oxygène, tels que le radical hydroxyle extrêmement réactif ($\bullet\text{OH}$), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ainsi que le radical peroxy ($\text{RCOO}\bullet$), entre autres. (FERDJIOUI, 2020)

1.3. Antioxydants:

1.3.1. Définition:

Les antioxydants sont des substances capables de protéger les molécules vulnérables contre les dommages causés par l'oxydation. Ils agissent selon différents mécanismes en fonction de la nature de l'agent oxydant. Par exemple, ils peuvent neutraliser les radicaux libres nocifs, inhiber les enzymes favorisant l'oxydation ou encore chélater les ions métalliques actifs susceptibles d'initier ce processus. Ainsi, les antioxydants constituent un système de défense essentiel permettant de ralentir ou d'empêcher les effets délétères de l'oxydation. (HOUAS, 2022)

1.3.2. Mécanismes d'action des antioxydants:

Les antioxydants assurent la protection de l'organisme par différents mécanismes. Ils peuvent capter et neutraliser certaines espèces réactives de l'oxygène, stabiliser les molécules

radicalaires en s'y liant, réduire la toxicité des radicaux et des peroxydes, ainsi que chélater certains métaux impliqués dans les processus de dommages cellulaires.

Activité antibactérienne

2. Activité antibactérienne:

2.1. Bactéries

2.1.1. Définition

Les bactéries sont des organismes unicellulaires simples, appartenant aux procaryotes, et sont présentes dans tous les milieux. Elles possèdent généralement une paroi cellulaire constituée de glucides et se distinguent par leur petite taille, variant en moyenne de 0,5 à 2 micromètres de largeur et de 2 à 6 micromètres de longueur, bien que certaines espèces puissent atteindre des dimensions beaucoup plus importantes.

Elles présentent une grande diversité morphologique, notamment des formes sphériques (cocci), pouvant apparaître isolées, en paires, en amas ou en chaînes, ainsi que des formes allongées (bacilles), qui peuvent être droites, incurvées ou spiralées. La structure spécifique de la paroi cellulaire riche en peptidoglycane, ainsi que le mode de division cellulaire, sont des facteurs déterminants de ces différentes morphologies (Touhami, 2017).

2.1.2. Résistance bactérienne

La résistance antimicrobienne bactérienne (RAM) se définit comme la capacité des bactéries à ne plus être sensibles aux agents antibiotiques, rendant ainsi les infections plus diciles, voire impossibles, à traiter. Ce phénomène constitue l'une des principales menaces pour la santé publique au XXI^e siècle (Xuan et al., 2023). Une souche bactérienne est considérée comme résistante lorsqu'elle est capable de survivre à un traitement antibiotique. Toutefois, dans un organisme vivant, l'efficacité d'une antibiothérapie ne dépend pas uniquement de la résistance intrinsèque de la bactérie, mais également de plusieurs facteurs, notamment le site de l'infection, la dose administrée, la voie d'administration de l'antibiotique, ainsi que l'état du système immunitaire du patient (Muylaert et Mainil, 2012).

2.1.3. Mécanismes de la résistance bactérienne

Les bactéries peuvent développer une résistance aux antibiotiques par divers mécanismes. Les mécanismes les plus fréquents comprennent l'inactivation enzymatique des antibiotiques, la modification ou le remplacement de la cible antibiotique, l'efflux actif des molécules antimicrobiennes et la réduction de la perméabilité de la membrane bactérienne. D'autres mécanismes, moins courants, tels que la protection de la cible ou sa surexpression, sont généralement spécifiques à certaines classes d'antibiotiques (Muylaert et Mainil, 2012).

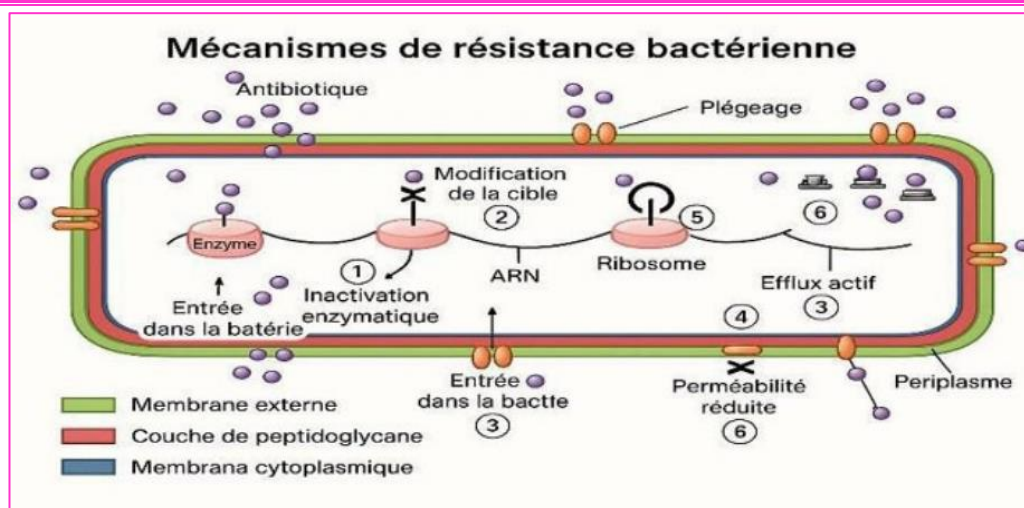


Figure 19: Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez une bactérie à Gram négatif

Bacterial sensitivity

3. Activité antidiabétique :

De nombreuses plantes constituent des réservoirs abondants de composés bioactifs présentant des propriétés pharmacologiques spécifiques, souvent dépourvues d'effets secondaires indésirables. Depuis plusieurs générations, les populations des pays en développement ont largement recours aux thérapies à base de plantes, l'utilisation de plantes médicinales à faible coût représentant une approche couramment adoptée pour la prise en charge du diabète (Przeor, 2022).

3.1. Diabète :

Le diabète est défini comme un ensemble de troubles métaboliques caractérisés par une hyperglycémie chronique persistante. Cette élévation du taux de glucose sanguin s'accompagne d'altérations du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, résultant soit d'un déficit de sécrétion d'insuline, soit d'une inefficacité de son action au niveau des tissus cibles (DeFronzo et al., 2015).

3.2. Types de diabète :

Diabète de type 1 : il résulte d'une destruction auto-immune des cellules bêta du pancréas, entraînant une absence quasi totale de production d'insuline.

Diabète de type 2 : il est caractérisé par une résistance des cellules à l'action de l'insuline, réduisant ainsi son efficacité dans la régulation de la glycémie.

Diabète gestationnel : il apparaît pour la première fois au cours de la grossesse chez des femmes n'ayant pas de diabète préexistant (Kebir, 2018).

3.3. Régulation enzymatique du glucose

3.3.1. Alpha-amylases

Les alpha-amylases sont des enzymes impliquées dans l'hydrolyse des polysaccharides complexes, tels que l'amidon et le glycogène, par clivage aléatoire des liaisons glycosidiques entre les unités glucidiques. Elles appartiennent à la famille des glycoside hydrolases GH-13 et conduisent à la formation de glucose, de maltose ainsi que de fragments glucidiques ramifiés appelés dextrines α .

Les dextrines limites. Elles agissent en conservant la configuration alpha des unités glucidiques et sont capables de contourner les points de ramification des chaînes glucidiques (Kherouf, 2021).

3.3.1.1. Mécanisme d'action:

Principaux mécanismes d'action des substances naturelles antidiabétiques L'activité antidiabétique des extraits végétaux ne se limite pas à une seule voie physiologique, mais résulte d'une synergie entre plusieurs mécanismes d'action complémentaires. Selon, ces mécanismes peuvent être synthétisés comme suit : Inhibition des enzymes clés du métabolisme glucidique : C'est le mécanisme le plus direct, impliquant l'association des composés phénoliques aux sites actifs des enzymes (α -amylase et α -glucosidase). Cette interaction empêche la liaison du substrat, ralentissant ainsi la dégradation des polysaccharides en sucres simples. Réduction de l'absorption intestinale du glucose : Certains métabolites secondaires, tels que les saponines et les fibres, agissent en créant une barrière physique ou en interférant avec les transporteurs membranaires (SGLT1 et GLUT2) au niveau des entérocytes, ce qui limite l'hyperglycémie postprandiale. Action insulino-stimulante et cytoprotectrice : Les extraits naturels peuvent favoriser la régénération des cellules β des îlots de Langerhans ou stimuler directement la sécrétion d'insuline. De plus, ils exercent un rôle protecteur contre l'apoptose cellulaire induite par la toxicité du glucose. Potentiel antioxydant et lutte contre le stress oxydatif : Le diabète étant étroitement lié à une production excessive de radicaux libres, les antioxydants végétaux (polyphénols, flavonoïdes) protègent les tissus pancréatiques et périphériques contre les dommages oxydatifs, améliorant ainsi la gestion métabolique globale (Hala et al, 2024).

La prise en charge du diabète repose sur deux grandes catégories de traitements : les traitements non pharmacologiques, comprenant les mesures hygiéno-diététiques, et les traitements pharmacologiques, incluant les antidiabétiques oraux (ADO) et l'insulinothérapie.

3.4. Traitements non médicamenteux:

La perte de poids associée à une activité physique régulière et adaptée contribue à l'amélioration du contrôle glycémique et à la réduction de la résistance à l'insuline.

Une alimentation équilibrée, pauvre en graisses saturées, en sucres simples et en alcool, constitue un élément fondamental de la prise en charge du diabète.

Les modifications du mode de vie doivent être instaurées dès que le taux d'HbA1c dépasse 6 %.

3.5. Traitements médicamenteux:

Antidiabétiques oraux (ADO)

Les sulfamides hypoglycémiants : Carbutamide, Glipizide, Glibenclamide, Gliclazide, Glibornuride, Glimépiride.

Les biguanides : Metformine.

Les inhibiteurs des alpha-glucosidases : Acarbose, Miglitol.

Les Activité anti-inflammatoire

Le chardon-Marie (*Silybum marianum*) semble présenter une activité anti-inflammatoire marquée. Cet effet serait attribué aux composés issus de la dégradation de la silymarine, lesquels agiraient en réduisant les processus inflammatoires au niveau des tissus de l'organisme. Il convient toutefois de souligner que ces résultats proviennent principalement d'études préliminaires (M. C. Sidhu¹, Punima Saini, 2012).

4.1.Définition de l'inflammation

L'inflammation constitue un mécanisme de défense de l'organisme. Qu'elle soit déclenchée par une lésion physique, une exposition à des agents chimiques ou une infection par des micro-organismes, la réaction inflammatoire intervient afin d'éliminer l'agent causal et de réparer les tissus endommagés. Ce processus immunitaire essentiel contribue au maintien de l'intégrité de l'organisme (FERDJIOUI, 2020).

4.2.Types d'inflammation

aiguë : ce processus est généralement intense et se caractérise par Inflammation des modifications vasculo-exsudatives marquées (Kouachi, M., 2017).

Inflammation chronique : les réponses inflammatoires aiguës évoluent vers des formes subaiguës puis chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste au sein des tissus (Kouachi, M., 2017).

4.3.Médiateurs de l'inflammation

Les réactions inflammatoires entraînent la production et la libération de nombreux médiateurs inflammatoires, classés en médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Certains médiateurs, comme l'IL-12, peuvent toutefois exercer des effets à la fois pro- et anti-inflammatoires. Parmi les principaux médiateurs impliqués dans les maladies humaines

figurent les cytokines, les chimiokines, les eicosanoïdes ainsi que le facteur de transcription NF- κ B, considéré comme un régulateur majeur de la réponse inflammatoire (Azab, 2016).

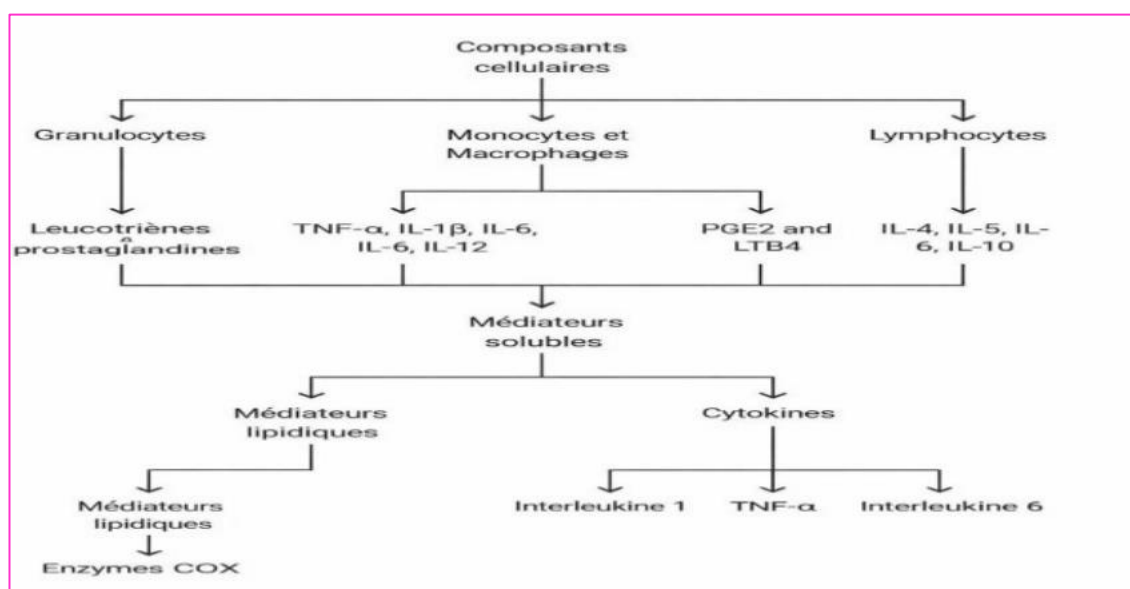


Figure 20: Différents médiateurs de l'inflammation (Bahi, 2015).

5.1. Cyclooxygénase

La cyclooxygénase (COX), également appelée synthase des prostaglandines G/H, est une enzyme clé du métabolisme de l'acide arachidonique et de la synthèse des prostanoïdes impliqués dans l'inflammation (Copeland, 1994). Parmi les prostaglandines, la PGE2 joue un rôle important dans plusieurs fonctions physiologiques, mais son dérèglement est associé à diverses pathologies inflammatoires. La synthèse des prostaglandines débute par la libération de l'acide arachidonique par la PLA2, puis sa conversion en prostaglandines par les enzymes COX, notamment la COX-2, fortement impliquée dans les processus inflammatoires. Les leucotriènes, produits par l'enzyme 5-LOX, participent également au développement de maladies inflammatoires, tandis que la synthèse de l'oxyde nitrique (NOS), en particulier sa forme inductible iNOS, contribue aux réactions pro-inflammatoires par la production d'oxyde nitrique (NO) (Azab, 2016).

5.2. Anti-inflammatoires

Les AINS agissent en inhibant les enzymes COX (surtout COX-2) afin de réduire la synthèse des prostaglandines inflammatoires, avec des effets secondaires possibles liés à l'inhibition de COX-1 (Ferdjioui, 2020), tandis que les anti-inflammatoires stéroïdiens (SAIDs), dérivés du cortisol, exercent une action anti-inflammatoire et immunosuppressive en inhibant la phospholipase A2 et la production des médiateurs inflammatoires (prostaglandines, leucotriènes) ainsi que l'expression des cytokines (Ferdjioui, 2020).

6. Activité Anti-ulcéreux gastrique :**6.1. Définition Ulcère gastrique :**

L'ulcère gastrique est une lésion localisée et profonde atteignant la muqueuse de l'estomac ou du duodénum, pouvant s'étendre à la sous-muqueuse et parfois à la couche musculaire. Il se distingue des érosions superficielles par sa profondeur et laisse généralement une cicatrice après cicatrisation. Il peut également toucher d'autres segments du tube digestif, notamment l'œsophage ou le duodénum (Afrit, 2022 ; Marguet, 2009).

6.2. Physiopathologie de l'ulcère gastrique :

L'ulcère gastrique résulte d'un déséquilibre entre les facteurs de défense de la muqueuse (mucus, bicarbonates, perfusion sanguine et protection cellulaire) et les facteurs agressifs (acide chlorhydrique, pepsine et gastrine). La maladie apparaît lorsque les facteurs agressifs prédominent ou lorsque les mécanismes de défense sont affaiblis (Gimenez et al., 2000 ; Sherwood, 2006 ; Calop et al., 2008).

L'acide chlorhydrique joue un rôle central en créant un important gradient de concentration en ions H^+ entre la lumière gastrique et les cellules épithéliales de surface, favorisant leur diffusion vers la muqueuse, notamment en cas de diminution du pH ou de réduction de la perfusion sanguine (Benia et Amroune, 2006).

Cette infiltration entraîne des lésions tissulaires, aggravées par l'action de la pepsine, conduisant à l'érosion et à l'extension des lésions ulcéreuses (Kodjoh, 2014).

6.3 Traitement :

Le traitement de l'ulcère gastrique repose principalement sur la réduction de la sécrétion acide gastrique et la protection de la muqueuse. Il comprend l'utilisation des antiacides, qui neutralisent l'acidité et forment une couche protectrice, ainsi que des alginates, qui constituent une barrière gélifiée limitant le reflux gastro-œsophagien. Les antihistaminiques H_2 sont également utilisés pour diminuer la sécrétion acide et peuvent être intégrés dans les protocoles d'éradication de *Helicobacter pylori* (Afrit, 2022 ; Wiart, 2015).

Les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) représentent les traitements les plus efficaces, agissant par inhibition de l'enzyme H^+/K^+ ATPase responsable de la sécrétion acide. Les anticholinergiques contribuent également à la réduction de cette sécrétion par blocage des récepteurs muscariniques M_1 (Kirkia, 1996).

Par ailleurs, l'intérêt pour les plantes médicinales est croissant, notamment *Echinops spinosissimus*, en raison de ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, ainsi que de son potentiel rôle protecteur de la muqueuse gastrique, suggérant une application prometteuse dans la prévention et le traitement de l'ulcère gastrique (Adoue, 2016 ; Wichtl et al., 2003).

7. Activité Anti-glycation:**7.1. Définition de la glycation:**

La glycation est une réaction chimique non enzymatique qui se produit entre les sucres réducteurs (tels que le glucose et le fructose) et les protéines ou les acides aminés présents dans l'organisme. Ce processus conduit à la formation de composés appelés produits de glycation avancée (AGEs : Advanced Glycation End Products), qui s'accumulent progressivement au cours du temps et modifient la structure ainsi que la fonction des protéines.

La glycation est considérée comme une composante de la réaction de Maillard et se déroule naturellement dans l'organisme, mais elle est accélérée par l'hyperglycémie, le vieillissement et une alimentation riche en sucres ou en aliments soumis à des cuissons à haute température (AFME, 2025).

7.2 Mécanisme de la glycation:

Le mécanisme de la glycation se déroule en plusieurs étapes successives:

✓ Étape initiale (formation de la base de Schiff)

Les molécules de sucre réducteur réagissent de manière spontanée avec les groupements amines libres des protéines, formant une structure instable appelée base de Schiff.

✓ Réarrangement moléculaire

La base de Schiff subit un réarrangement intramoléculaire pour donner un composé plus stable, appelé produit d'Amadori. Cette étape marque le début des modifications structurales des protéines.

✓ Étapes avancées (formation des AGEs)

Le produit d'Amadori subit ensuite des réactions complexes d'oxydation, de déshydratation et de condensation, conduisant à la formation de composés stables et irréversibles appelés produits de glycation avancée (AGEs) (AFME, 2025).

7.3 Conséquences biologiques

L'accumulation des AGEs entraîne:

une réticulation des protéines, notamment le collagène et l'élastine,

une diminution de l'élasticité et de la souplesse des tissus,

une augmentation du stress oxydatif,

une activation des processus inflammatoires chroniques,

et une altération des fonctions cellulaires et métaboliques. (AFME, 2025)

Chapitre III :

Contexte théorique des techniques expérimentales

1. Techniques expérimentales

1.1.Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible est une technique courante et puissante d'analyse moléculaire, fondée sur l'absorption de la lumière par les substances. En mesurant cette absorption dans les régions ultraviolette et visible du spectre électromagnétique (plus précisément pour des longueurs d'onde comprises entre 100 et 800 nanomètres), il est possible d'obtenir des informations sur la structure de certaines molécules et de déterminer les quantités des différentes espèces présentes. Cette méthode, appelée spectrophotométrie, est également très utile en chimie physique pour étudier l'établissement de l'équilibre des réactions chimiques ainsi que leur cinétique en solution. La lumière se comporte comme une onde électromagnétique dont l'énergie est transportée sous forme de quanta appelés photons. Lors de sa propagation, cette onde oscille en formant des crêtes et des creux. La longueur d'onde, propriété fondamentale de la lumière, correspond à la distance séparant deux crêtes ou deux creux consécutifs. Rayons UV (de 100 à 400 nm).

✓ Lumière visible (de 400 à 800 nm) (Benbahmed et Outaleb, 2018).

✓ La loi de Beer-Lambert est un principe fondamental qui décrit la quantité de lumière absorbée par une substance.

✓ Cette relation s'écrit :

$$A = \log(I_0 / I)$$

✓ Ou, sous sa forme actuelle :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

Avec :

A : absorbance.

ε : coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$).

C : concentration ($mol \cdot L^{-1}$).

l : épaisseur (longueur de trajet optique) de la cuve.

I_0 : intensité du rayonnement incident arrivant sur l'échantillon.

I : intensité du rayonnement transmis à travers l'échantillon (Ibrahim et Ouazine, 2014).

1.1.1 Principe de La spectroscopie UV -Visible:

En spectroscopie UV-Visible, les transitions électroniques moléculaires impliquent des variations énergétiques parmi les plus importantes en chimie, se situant généralement entre 160 et 665 $kJ \cdot mol^{-1}$. Étant donné que ces valeurs sont comparables aux énergies de cohésion intramoléculaire, l'absorption de rayonnements UV ou visibles peut s'avérer suffisamment

intense pour provoquer des ruptures de liaisons chimiques. Néanmoins, ce phénomène se traduit le plus souvent par la simple excitation des électrons vers des niveaux énergétiques supérieurs au sein de la molécule (Baudouin, 2012).

1.2 Docking moléculaire :

Le docking moléculaire constitue une étape essentielle pour déterminer la manière dont de petites molécules, appelées ligands, peuvent se fixer sur un site spécifique d'une macromolécule. Cette approche consiste à tester virtuellement différentes conformations, positions et orientations du ligand au sein du site de liaison. Seules les configurations les plus prometteuses, suggérant des interactions fortes et favorables, sont retenues pour une analyse approfondie. Cette méthode computationnelle est particulièrement précieuse en biologie, en pharmacie et en médecine, car de nombreux médicaments exercent leur action en se liant à des cibles biologiques spécifiques (EL Hadj Said, 2016; Lanez, 2016).

1.2.1 Principes du docking moléculaire :

Le docking moléculaire repose sur un processus en deux étapes. Dans un premier temps, le ligand est positionné dans le site actif de la protéine, et différentes possibilités d'ajustement (conformation, localisation et orientation) sont explorées. Seules les configurations présentant les interactions de liaison les plus favorables sont conservées.

Dans un second temps, ces configurations sont évaluées et classées en fonction de leur affinité prédite pour la protéine. Ce système de score permet d'identifier le mode de liaison le plus probable (EL Hadj Said, 2016). Les algorithmes de Docking moléculaire Les plus performants doivent être capables de prédire avec précision le mode de liaison observé expérimentalement. De plus, leurs fonctions de score doivent classer cette conformation correcte comme la plus probable parmi toutes les solutions générées (Bouchagra, 2018).

Le score de docking estime approximativement la variation de l'énergie libre associée à la formation du

complexe protéine–ligand, sur la base des principes thermodynamiques (Arrault, 2007) :

$$\Delta G = \Delta G_{\text{du complexe}} - \Delta G_{\text{du ligand}} - \Delta G_{\text{de la protéine}}$$

En théorie, pour qu'une protéine et un ligand s'associent spontanément et forment un complexe stable, la variation globale de l'énergie libre de Gibbs au cours du processus de liaison doit être négative ($\Delta G_{\text{complexation}} < 0$) (Lebbad, 2016).

1.2.2 Steps of Moléculaire Docking

Molecular docking typically involves these main steps: selecting the 3D structures of the target and ligand, preparing these structures for the specific docking method, and then analyzing the results. (Morris, 2008).

1.2.3 Outils du docking moléculaire

La mise en œuvre pratique du docking moléculaire nécessite les éléments suivants :

c) Protéine : macromolécule

Pour réaliser un Docking moléculaire, l'étape initiale la plus importante consiste à disposer de la structure

Tridimensionnelle de la molécule étudiée (dans ce cas, une enzyme) (Dar et Mir, 2017). Heureusement, ces

Informations sont facilement accessibles dans des bases de données protéiques telles que la Protéine Data Bank

(PDB).

d) Ligand

L'obtention de la structure 3D du ligand est essentielle pour le Docking moléculaire. Ces structures peuvent être

téléchargées à partir de bases de données (telles que ZINC ou PubChem) ou générées à l'aide de logiciels de

modélisation (comme Chem Sketch ou Gaussian), via une optimisation géométrique fondée sur des méthodes de

chimie quantique (Jade et Gupta, 2016 ; El Hadji Said, 2016).

Modélisation moléculaire

Dans le cadre du docking moléculaire, les structures des ligands doivent être optimisées par des techniques de

modélisation moléculaire afin d'obtenir des conformations énergétiquement favorables.

1.2.4 Programmes de Docking

Les programmes de docking moléculaire constituent des outils essentiels en recherche biologique,

pharmaceutique et médicale (Amina et Khaoula, 2017). Plus de 30 logiciels, commerciaux et non commerciaux, sont disponibles ; parmi les plus utilisés figurent Surflex, GOLD, FlexX, DOCK et Auto Dock.

L'un des principaux avantages de ces programmes est leur capacité à cribler rapidement de vastes bibliothèques

de molécules. Ils reposent sur diverses approches computationnelles spécialisées, telles que les algorithmes

génétiques, les méthodes de Monte Carlo et les algorithmes de construction incrémentale (Dias et al., 2008 ;

Forli et al., 2016).

1.2.4.1 Logiciel de docking moléculaire AutoDock

AutoDock est un logiciel de docking moléculaire qui utilise la simulation de trajectoires pour prédire avec

précision les modes de liaison. Il commence par positionner le ligand à l'extérieur du site de liaison du

récepteur le site actif et explore la région de liaison au moyen de translations, de rotations et de modifications

conformationnelles itératives. Après chaque mouvement, une fonction d'énergie évalue l'interaction ligand–

récepteur, et les variations d'énergie obtenues orientent les mouvements suivants. La simulation s'arrête lorsque

la conformation de liaison optimale (pose optimale) est identifiée.

Cette méthode prend efficacement en compte la flexibilité du ligand et permet une exploration approfondie du

site de liaison (Lanez, 2019).

Serveurs utilisés

1.3.SwissADME

SwissADME est un outil en ligne gratuit qui utilise des modèles informatiques pour prédire rapidement et de manière fiable des propriétés importantes des molécules à potentiel médicamenteux. Ces propriétés incluent leurs caractéristiques physicochimiques, leur devenir dans l'organisme (ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion), leur similarité avec des médicaments existants ainsi que leur aptitude à un usage thérapeutique. Le site est convivial et permet aussi bien aux spécialistes qu'aux non-spécialistes de soumettre facilement plusieurs molécules et d'interpréter les prédictions obtenues, contribuant ainsi au processus de découverte de médicaments (Daina et al., 2017).



Figure 21: Page d'accueil du serveur SwissADME

1.4 La base de données PubChem:

La base de données PubChem a été lancée en 2004 et est depuis devenue une source majeure d'informations chimiques

destinée au grand public, aux étudiants et aux chercheurs. Chaque mois, ses services informatiques et en ligne fournissent des données à des millions d'utilisateurs à travers le monde.

PubChem contient principalement des petites molécules, mais également des molécules de plus grande taille telles que les nucléotides, les peptides, les lipides, les glucides ainsi que des macromolécules présentant des modifications chimiques. La base de données rassemble des informations relatives aux identifiants chimiques, aux structures et aux propriétés, ainsi

qu'aux activités biologiques, chimiques et physiques, aux brevets, aux données de sécurité, de santé et de toxicité, entre autres (Trad, 2020).



Figure 22: Interface principale de la base de données PubChem

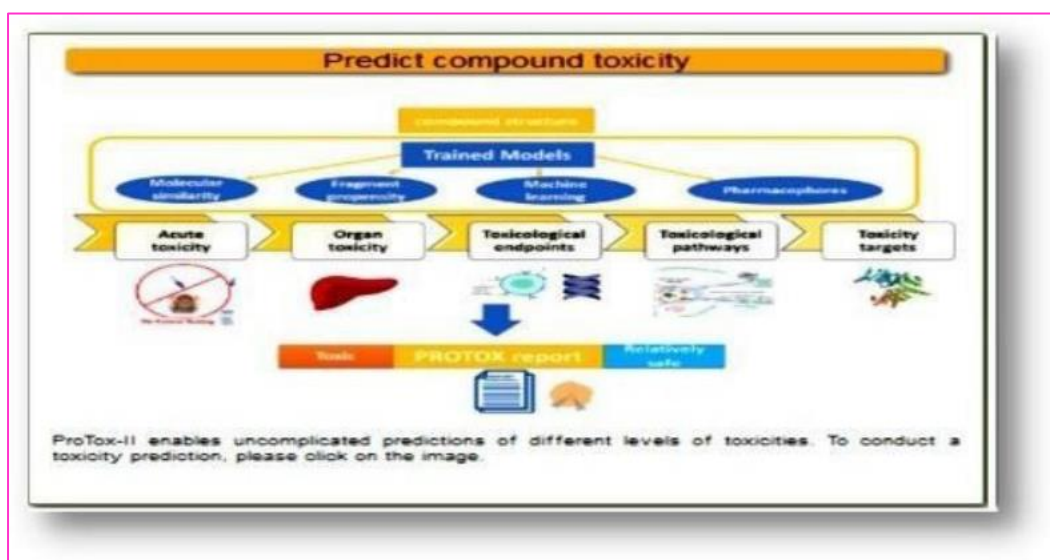


Figure 23: Page d'accueil du serveur ProTox.

ProTox-II est un outil en ligne gratuit (accessible à l'adresse http://tox.charite.de/protox_II sans nécessité d'inscription) permettant de prédire la toxicité potentielle d'un composé chimique. Il est destiné aux toxicologues, aux organismes de réglementation, aux chimistes computationnels et médicaux, ainsi qu'à toute personne intéressée par l'évaluation toxicologique.

L'utilisateur saisit simplement la structure bidimensionnelle (2D) du composé, et ProTox-II génère un profil de toxicité prédit basé sur 33 modèles différents, en indiquant le

niveau de confiance associé à chaque prédiction. L'outil fournit également un diagramme radar résumant la toxicité globale et compare le composé étudié aux trois substances les plus similaires dont la toxicité aiguë est connue (Banerjee et al., 2018)

1.5. AutoDockTools:

AutoDock Tools est une interface graphique gratuite développée par les concepteurs d'AutoDock afin de faciliter la préparation, l'exécution et l'analyse des calculs de docking réalisés avec AutoDock ainsi que des calculs de grilles énergétiques effectués avec AutoGrid. Ce logiciel propose également des fonctionnalités permettant la préparation des structures du récepteur et du ligand (ajout d'atomes d'hydrogène, attribution des charges, définition des liaisons rotatives), la définition des paramètres de la grille de calcul et la visualisation des interactions ligand–protéine, le calcul des surfaces moléculaires, la visualisation des structures secondaires, l'analyse des liaisons hydrogène, ainsi que d'autres opérations de modélisation moléculaire (Ahmedou, 2021).

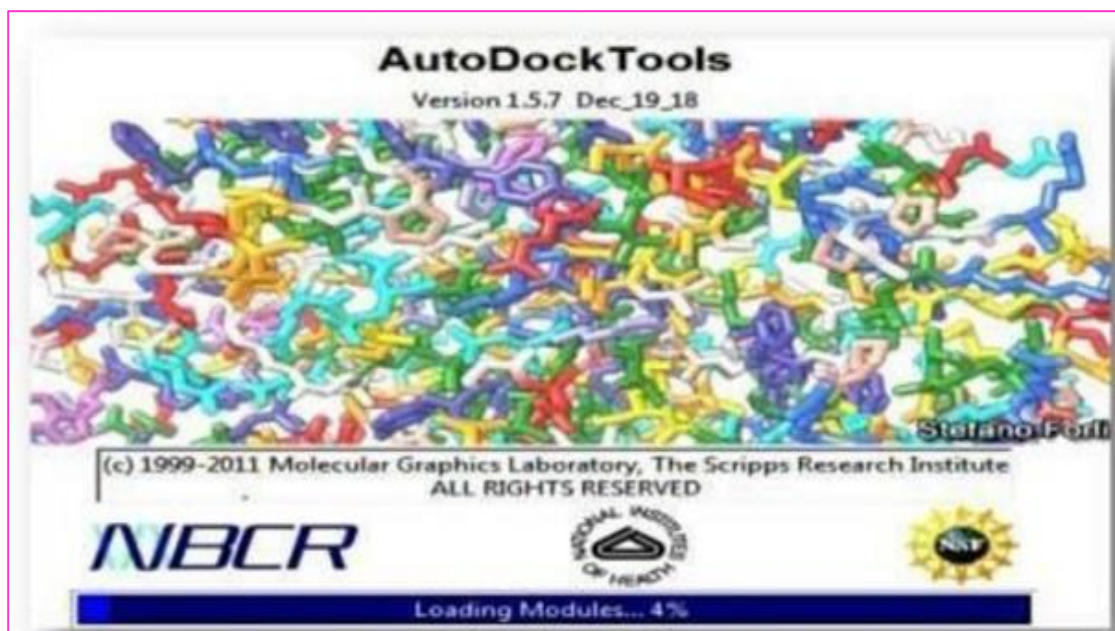


Figure 24: Interface principale du serveur Auto Dock Tools

1.6. DiscoveryStudio:

DiscoveryStudio est une plateforme logicielle polyvalente utilisée pour la simulation et la modélisation de systèmes impliquant des petites et des grandes molécules.

Ses applications comprennent les simulations moléculaires, la conception de ligands, le développement de pharmacophores, les stratégies de conception basées sur la structure (structure-based design), les analyses QSAR (relations quantitatives structure–activité) ainsi que le

profilage ADMET (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité) (Ahmedou, 2021).

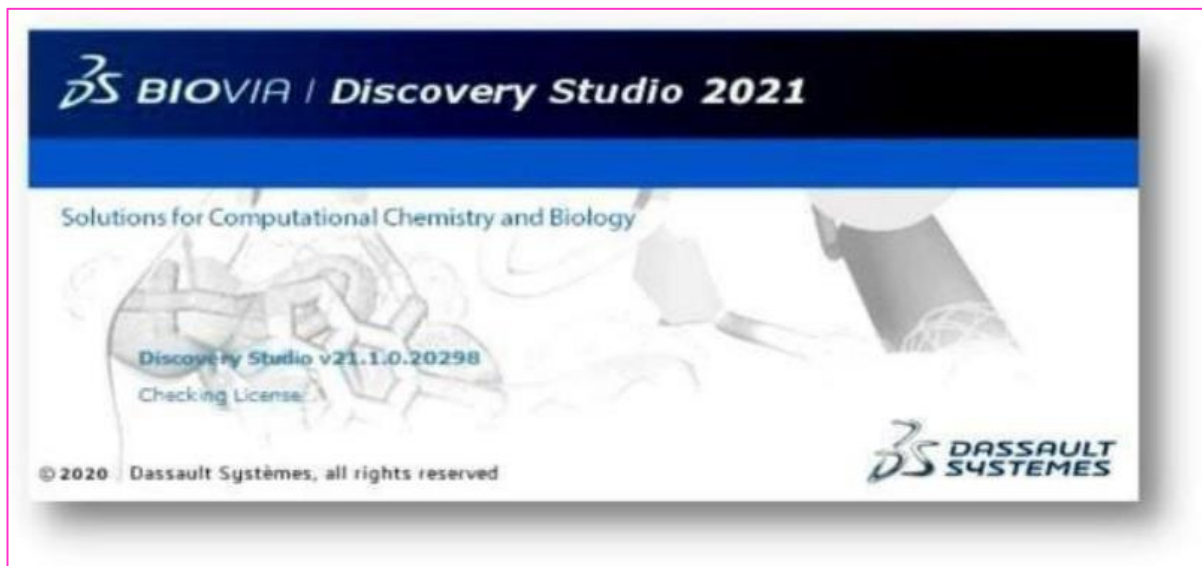


Figure 25: Interface principale du serveur Discovery Studio.

1.7. La Protein Data Bank (PDB) :

La PDB, ou Protein Data Bank, constitue le principal dépôt mondial de structures tridimensionnelles (3D) de macromolécules biologiques, accessibles librement. Les chercheurs du monde entier y contribuent en déposant leurs données structurales, une pratique souvent exigée par les principales revues scientifiques. La PDB dispose d'une base d'utilisateurs internationale et diversifiée, comprenant des biologistes de différentes disciplines (comme la biologie structurale et la pharmacologie), des bio-informaticiens, des développeurs de logiciels, des enseignants et des étudiants à tous les niveaux, des communicateurs scientifiques ainsi que le grand public. Par conséquent, la PDB attire chaque mois environ 140 000 visiteurs uniques provenant d'environ 140 pays (Dorey, 2012).



Figure 26: Page d'accueil du serveur Protein Data Bank (PDB).

1.8. PyMOL:

PyMOL (Méthodologie de l'analyse pleomorphe) est un logiciel libre et open-source développé par Warren Lyford DeLano pour la visualisation moléculaire en trois dimensions (3D). Il permet de produire des représentations de haute qualité, aussi bien pour les petites que pour les grandes

molécules, ce qui en fait un outil précieux pour la recherche scientifique et l'enseignement, notamment en biologie structurale.

Sa disponibilité en open-source facilite son utilisation au sein des communautés éducatives et scientifiques.

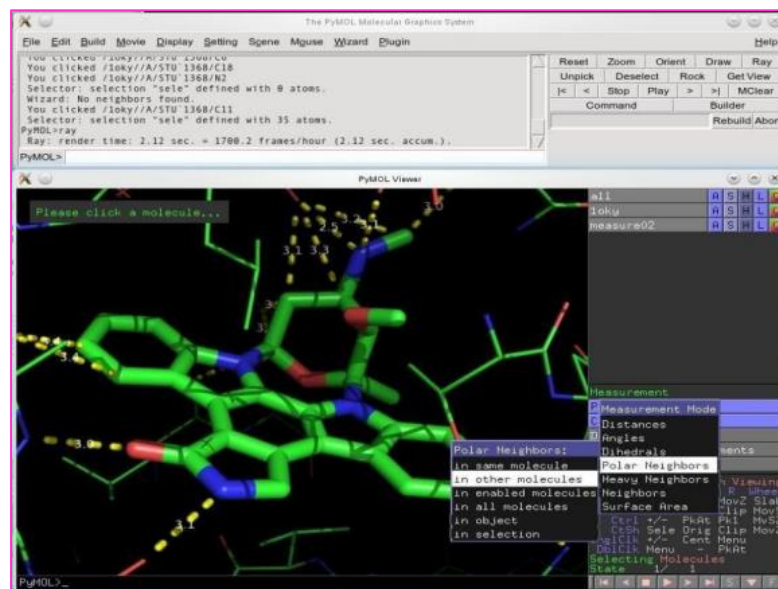


Figure 27: Interface du logiciel PyMOL.

1.9 PLIP

PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler) est un outil en ligne permettant d'examiner et de visualiser les interactions entre les protéines et les petites molécules en trois dimensions. Ce serveur peut également identifier les sites de liaison des molécules sur les protéines, prédire les interactions potentielles et analyser en détail les atomes spécifiques ainsi que les forces moléculaires impliquées dans ces interactions (Salentin, 2015).

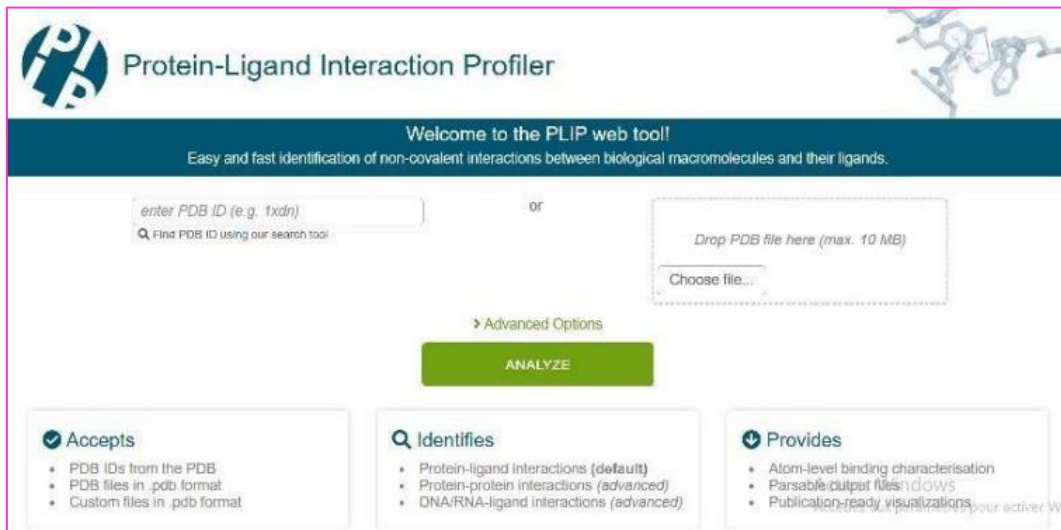


Figure 28: Page d'accueil du serveur PLIP.

Deuxième partie

Chapitre I

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de recherche : Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes (VTRS), Faculté des Sciences et de la Technologie, Université Chahid Hamma Lakhdar d'El Oued. Le criblage phytochimique a été effectué dans les laboratoires pédagogiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de la même université.

Ce travail a pour objectif d'extraire le principe actif de *Echinops spinosissimus*, à savoir la silymarine (Silymarin), puis d'étudier ses effets biologiques.

A. Étude in vitro

I. Matériel

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué des graines de *Echinops spinosissimus*. Les graines ont été broyées à l'aide d'un moulin électrique, puis la poudre obtenue a été récupérée et conservée pour une utilisation ultérieure.

2. Matériel bactérien

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont :

- ✓ *Escherichia coli* (EC)
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* (KP)
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* (PA)
- ✓ *Enterococcus faecalis* (EF)
- ✓ *Bacillus subtilis* (BS)
- ✓ *Staphylococcus aureus* (SA)

3. Matériel biologique

* Sang humain provenant d'un sujet sain

4. Produits chimiques et réactifs

Tableau 5: Produits chimiques et réactifs

Phosphate monobasique de potassium (NaH_2KPO_4)	Phosphate dibasique de sodium anhydre ($\text{Na}_2\text{HK}_2\text{PO}_4$)
Réactif de wagner	Eau distillée
Chlorure de fer(FeCl_3) 1%	Gélose nutritive
Anhydride acétique	Antibiotique (Amoxicillin)
Acid sulfurique (H_2SO_4)	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (Dpph)
Magnésium	Méthanol
Chloroforme (CHCl_3)	Mé amlase(Alfa-amylase)
Acid chlorhydrique (HCl)	Amidon
Hydroxyde sodium (NaOH) 1%	Solution de Lugol
Hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) 25%	Chlorure de potassium (KCl)
Albumine sérique bovine(BSA)	Tyrosine
Acide éthylènediaminetétraac (EDTA)	Zinc
Bleu méthylène	

II. Méthode

1. Préparation de l'extrait

Principe de l'extraction solide-liquide :

L'extraction solide-liquide repose sur le principe de la diffusion des composés d'une matrice solide vers un solvant liquide. Lorsque le solide est immergé, le solvant liquide facilite le transfert des composés solubles depuis l'intérieur du solide vers sa surface, puis vers la phase liquide. Ce processus, régi par la diffusion, est principalement réalisé par macération, une technique d'extraction simple et économique. La macération nécessite un récipient pouvant être fermé hermétiquement, généralement en verre ou en acier inoxydable, dans lequel la matrice solide est complètement immergée dans le solvant liquide (Naviglio, D. et al., 2019) .

Méthode opératoire :

Extraction des graines :

- 100g de graines mélangées à 50 mL d'éthanol et 500 mL d'eau distillée.
- Le mélange est incubé dans des béchers, recouverts de papier aluminium, pendant 24 heures.

Filtration initiale :

- * Le mélange est filtré à l'aide d'une passoire.
- * Le filtrat est ensuite passé à travers du papier Whatman.

Séchage de l'extrait :

- * Après filtration et obtention de l'extrait, celui-ci est laissé à sécher dans un dessiccateur .

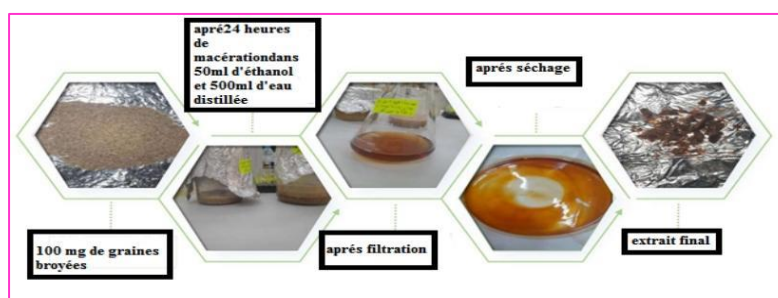


Figure 29 Rendement de l'extraction

2. Efficacité d'extraction

Le rendement de l'extraction permet de quantifier le pourcentage de métabolites secondaires extraits à partir d'une matrice donnée, dissous dans un solvant organique ou aqueux spécifique (Belhadi, L. et al., 2022).

Le rendement d'extraction est défini comme le rapport entre la masse de l'extrait sec, obtenue après évaporation du solvant, et la masse initiale de la poudre végétale.

Il est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$R\% = \left(\frac{Me}{Mv} \right) \times 100$$

R% : rendement en pourcentage

Me : masse de l'extrait après évaporation du solvant

Mv : masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction

3. Tests de criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est une méthode analytique rapide et économique visant l'identification qualitative des métabolites secondaires (alcaloïdes, flavonoïdes, etc.) présents dans les divers organes végétaux. Cette caractérisation est essentielle pour évaluer le potentiel pharmacologique de ces molécules bioactives, initialement synthétisées par la plante pour sa défense et sa signalisation. (Jan, S. et al., 2018).

3.1. Alcaloïdes :

2 mL de solution infusée sont mélangés avec 1,2 mL de réactif de Wagner (2 g d'iodure de potassium KI + 1,27 g d'iode I₂ + 100 mL d'eau distillée). La présence d'alcaloïdes est indiquée par la formation d'un précipité blanc-jaunâtre (**Soumia Saouli, B.A., 2020**).

3.2. Tanins:

1 mL de sirop dilué 1:10 est mélangé avec quelques gouttes (3–4) de solution de chlorure ferrique à 1 % (FeCl₃). Les tanins galliques sont indiqués par l'apparition d'une coloration bleu-noir après agitation, tandis que les tanins catéchiques donnent une teinte bleu-vert (**Kaddeche, A. et al., 2022**).

3.3. Stéroïdes:

Un mélange de 5 mL d'anhydride acétique, 5 mL de sirop dilué 1:10 et 0,5 mL d'acide sulfurique concentré (H₂SO₄) est utilisé. La présence de stéroïdes est confirmée lorsque la couleur passe du violet au bleu, puis revient au vert (**Seghiri, Y., 2021**).

3.4. Flavonoïdes:

1 mL d'extrait alcoolique est mélangé avec 0,5 g de copeaux de magnésium et quelques gouttes d'HCl concentré. Après trois minutes, l'apparition d'une coloration rose ou rouge indique la présence de flavonoïdes (**Terbagou, Y. et al., 2020**).

3.5. Trapézoïdes

3 mL d'H₂SO₄ concentré sont ajoutés à un mélange de 5 mL d'extrait méthanolique et 2 mL de chloroforme (CHCl₃). La formation d'un anneau brun-rouge à l'interface indique la présence de terpénoïdes (**Terbagou, Y. et al., 2020**).

3.6. Polyphénols:

Quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) sont ajoutées à 5 mL d'infusion. Le développement d'une coloration rouge indique la présence de polyphénols (**Azeb Athmane, S. et al., 2023**).

3.7. Glycosides cardiotoniques:

1 mL de chloroforme et 1 mL de sirop dilué 1:10 sont mélangés. Lors de l'ajout soigneux de 1 mL d'H₂SO₄ concentré, un revêtement rouge foncé se forme, indiquant la présence de glycosides cardiotoniques (**Seghiri, Y., 2021**).

3.8. Saponines:

1 mL d'eau distillée est mélangé avec 2 mL de chaque extrait, et le mélange est vigoureusement agité pendant une minute. La formation d'une mousse persistant 15 minutes indique la présence de saponines. Si la mousse dépasse 1 cm d'épaisseur, le test est considéré comme positif (**Samih, M., 2024**).

3.9. Quinones libres:

2 mL d'extrait sont mélangés avec quelques gouttes de NaOH à 1 %. La présence de quinones libres est indiquée par une coloration jaune, rouge ou violette (**Mazouzi, N. et al., 2019**).

3.10. Coumarines : fluorescence UV

1 mL d'extrait est introduit dans un tube à essai, suivi de l'ajout de 0,5 mL d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) à 25 %. Après agitation, la solution est observée sous lumière UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence de coumarines (**Azeb Athmane, S. et al., 2023**).

4. Dosage des polyphénols et flavonoïdes:

Préparation des extraits : 3 extraits de concentrations différentes dans 6 tubes :

- Tube 1 : 1 mg d'extrait + 2 mL d'eau distillée
- Tube 2 : 2 mg d'extrait + 2 mL d'eau distillée
- Tube 3 : 4 mg d'extrait + 2 mL d'eau distillée

4.1. Évaluation du contenu en polyphénols

Principe : Le réactif de Folin-Ciocalteu, composé de phosphomolybdate et de tungstate de sodium, oxyde les polyphénols, entraînant la réduction du tungstène et du molybdène en leurs oxydes respectifs (bleus), qui présentent une absorbance à 750 nm (**Benaoun, F., 2017**).

Méthode opératoire :

Préparation des réactifs :

* Réactif de Folin : dans un tube, ajouter 9 mL d'eau distillée avec 1 mL de Folin (protéger de la lumière avec du papier aluminium).

* Dans une fiole jaugée de 25 mL, ajouter 25 mL d'eau distillée avec 6,25 g de Na₂CO₃.

Test : Dans les 3 tubes, ajouter 100 µL d'extrait, 0,5 mL de Folin et 2 mL de Na₂CO₃. Après 30 minutes, mesurer l'intensité d'absorbance à 760 nm avec un spectrophotomètre.

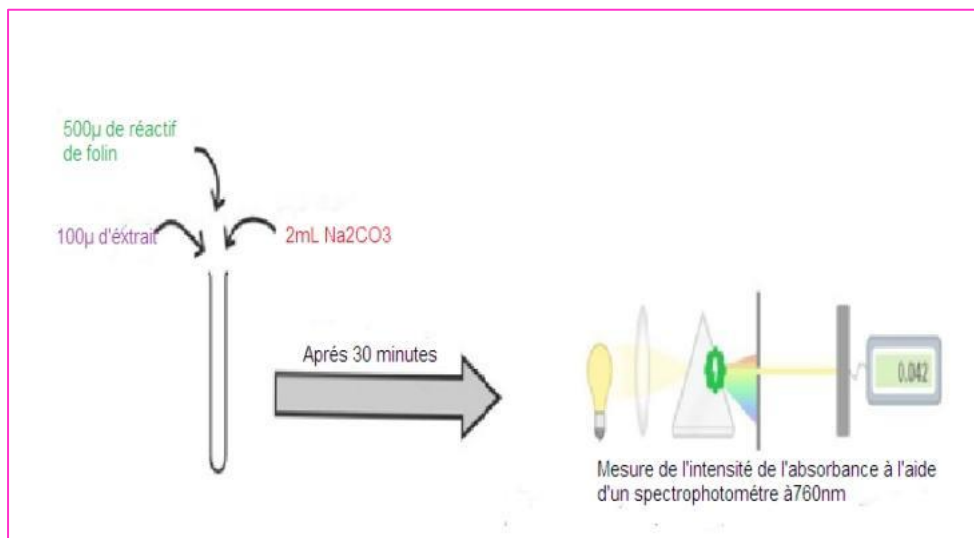


Figure 30: Schéma illustrant le protocole du dosage des polyphénols

4.2. Évaluation du contenu en flavonoïdes:

Principe :

La méthode la plus utilisée pour le calcul du contenu total en flavonoïdes repose sur la formation d'un complexe entre les groupes carbonyle et hydroxyle des flavonoïdes et l'ion aluminium (AlCl_3). L'absorption de ce complexe est mesurée à 425 nm avec certaines variations (**Tacherift, M. et al., 2023**).

Méthode opératoire :

Préparation des réactifs :

Dans une fiole jaugée de 25 mL, dissoudre 0,51 g d' AlCl_3 dans 25 mL d'eau distillée.

Test :

Dans les 3 tubes, ajouter 500 μL d'extrait et 0,5 mL (500 μL) d' AlCl_3 . Après 15 minutes, mesurer l'intensité d'absorbance à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

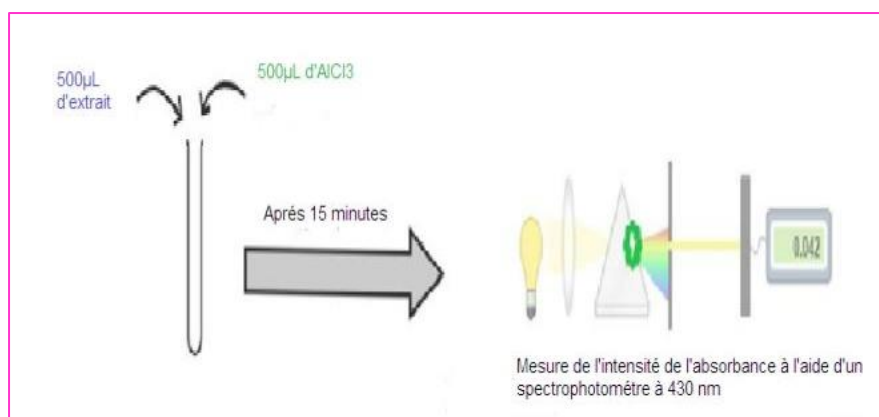


Figure 31: Schéma illustrant le protocole d'évaluation des flavonoïdes

5. Évaluation de l'activité antioxydante par spectrophotométrie UV-Visible

Principe :

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable caractérisé par un chromophore violet foncé. Lorsqu'il est réduit, ce chromophore passe à un état jaune pâle. Sous sa forme radicalaire, le DPPH présente une absorbance maximale à 517

nm ; cette absorbance diminue proportionnellement lors de la réduction par un antioxydant ou un agent piégeant les radicaux libres. L'activité de piégeage des radicaux libres a été quantifiée à l'aide du test DPPH, avec des modifications spécifiques du protocole standard (**Kabouche, A., 2016**).

Méthode opératoire :

Préparation de l'extrait :

Dissoudre 10 mg d'extrait dans 10 mL d'eau distillée (concentration initiale, relative 3).

Préparation de la solution de DPPH :

Dissoudre 5 mg de DPPH dans 50 mL de méthanol, stocker à l'obscurité.

Préparation de A_0 :

Mélanger 500 μ L d'eau distillée avec 500 μ L de DPPH dans un tube.

Préparation du blanc :

Mélanger 500 μ L d'eau distillée avec 500 μ L de méthanol (pour l'étalonnage de l'instrument).

Dilutions en série :

Les concentrations de l'extrait (1 à 0,1 mg/mL) sont préparées par dilution en série

Addition du DPPH :

Ajouter 500 μ L de DPPH à chacun des 10 tubes contenant les dilutions de l'extrait.

Incubation :

Incuber les tubes à l'obscurité pendant 30 minutes.

Mesure de l'absorbance :

Mesurer l'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.

Utiliser le blanc pour zéroter l'instrument.

Lire A_0 trois fois.

Lire les concentrations diluées de l'extrait du plus faible au plus élevé.

Le taux d'inhibition a été calculé selon la méthode de (**Kabouche, A 2016**) en utilisant l'équation suivante :

$$I(\%) = \left(\frac{A_0 - \text{Absorbance medium}}{A_0} \right) \times 100$$

- **I(%)** : taux d'inhibition
- **A0** : absorbance du témoin (contrôle)
- **Absorbance medium** : absorbance de l'extrait

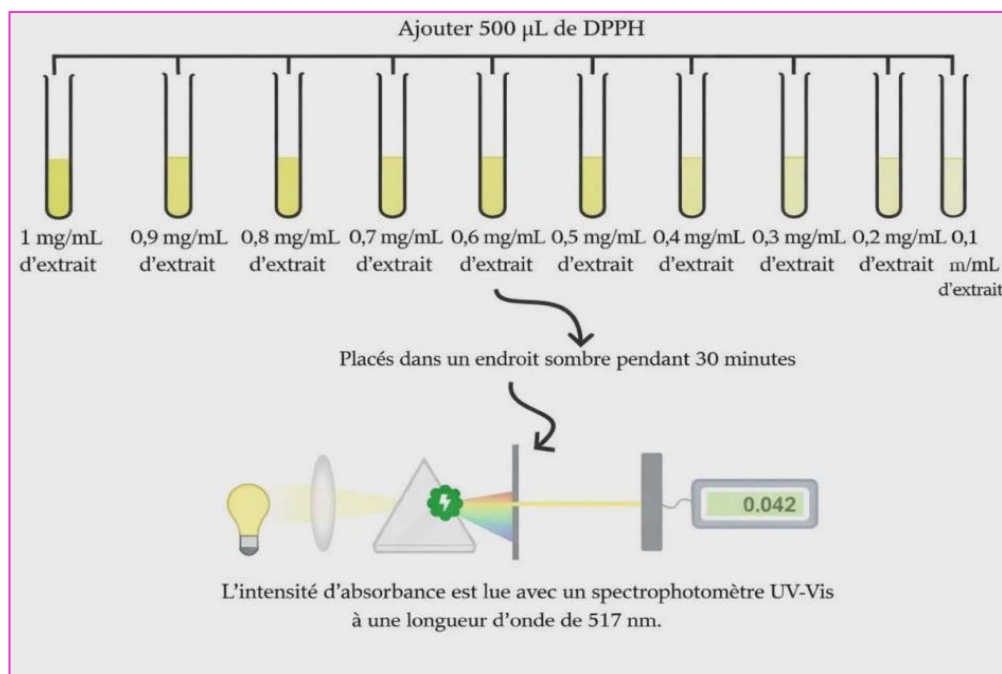


Figure 32: Schéma illustrant le protocole d'évaluation de l'activité antioxydante

6 . Évaluation de l'activité antibactérienne in vitro

Principe : L'antibiogramme, méthode permettant de déterminer la sensibilité bactérienne à un ensemble d'antibiotiques, a été réalisé afin d'établir le profil standard de résistance aux antibiotiques des souches bactériennes utilisées et de le comparer à l'efficacité de nos extraits bruts. Des disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche testée. La sensibilité bactérienne vis-à-vis de nos extraits a été évaluée selon le même protocole que celui utilisé pour les disques d'antibiotiques, mais en remplaçant ces derniers par des disques de papier imprégnés de l'extrait étudié. La méthodologie adoptée dans cette étude est conforme aux normes du NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (**Kabouche, A. 2016**)

Mode opératoire :

- Préparation de la gélose nutritive :
- ✓ La poudre de gélose nutritive a été pesée.

- ✓ Mélangé avec de l'eau distillée.
- ✓ Chauffé jusqu'à obtention d'une consistance épaisse.
- ✓ Le mélange est placé dans des fioles en verre et stérilisé à l'autoclave.
- ✓ La gélose nutritive est versée dans des boîtes de Petri et laissée jusqu'à ce qu'elle se solidifie.
- ✓ Six espèces bactériennes sont cultivées dans les boîtes de Petri, deux boîtes pour chaque type, et incubées pendant 24 heures.
- Dilution des extraits :
 - ✓ 7 tubes contenant chacun 0,5 mL d'eau distillée.
 - ✓ Des dilutions en série ont été effectuées en transférant 0,5 mL de la solution mère concentrée dans chaque tube suivant.
- Préparation du témoin positif :

L'antibiotique Amoxicilline a été dissous dans de l'eau distillée.
- Préparation des disques :

Des disques de 6 mm de diamètre ont été découpés dans du papier Wattman.
- Test antimicrobien :
 - ✓ Les boîtes de Petri ont été divisées en quatre sections (8 sections par type bactérien).
 - ✓ Les disques d'antibiotiques (témoin positif) et les disques d'extraits (dilutions en série) ont été placés dans chaque section.
 - ✓ Après 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en centimètres.
- Calcul du taux d'inhibition :

Le taux d'inhibition a été calculé selon la méthode d'Azeb Athmane et al. (2023) avec l'équation suivante :

$$I \% = \left[1 - \left(\frac{A}{B} \right) \right] \times 100$$

- **I %** : ratio d'inhibition de l'extrait sur les bactéries.
- **A** : valeur de la densité optique en l'absence de l'inhibiteur.
- **B** : valeur de la densité optique en présence de l'inhibiteur.

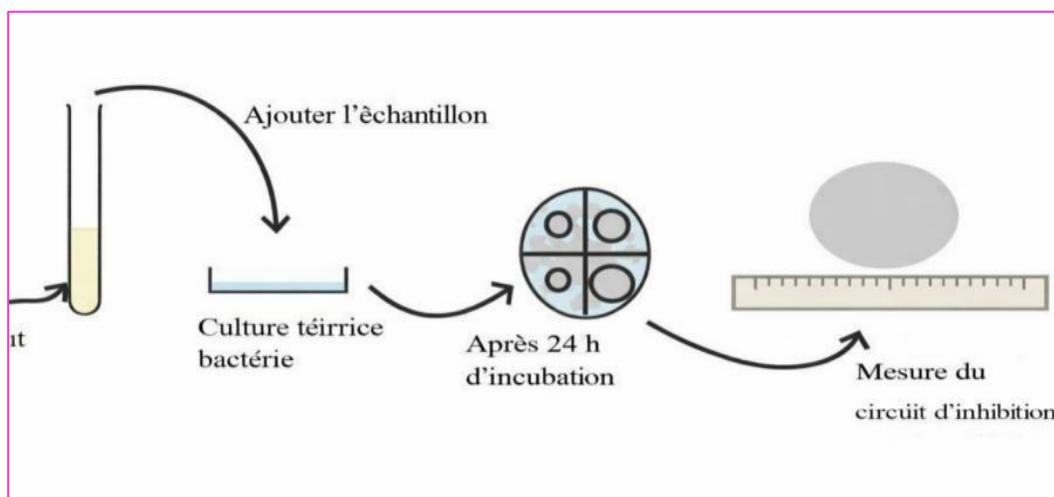


Figure 33: Schéma illustrant le protocole d'évaluation de l'activité antibactérienne

7. Évaluation de l'activité anti-diabétique

Principe :

En examinant la capacité des hydrolysats à inhiber l' α -amylase, le potentiel antidiabétique des échantillons a été évalué in vitro. Cet enzyme essentiel aide à décomposer les polysaccharides en monosaccharides, qui sont ensuite absorbés par l'organisme et passent dans la circulation sanguine (KHELIL et al., 2023).

Méthode opératoire :

- Préparation des extraits :
 - 20 mg d'extrait ont été dissous dans 1 mL d'eau distillée.
- Dilutions en série :
 - ✓ 19 tubes ont été préparés (17 tubes de test + 1 tube référence + 1 tube témoin).
 - ✓ 500 μ L d'eau distillée ont été ajoutés dans chaque tube.
 - ✓ Des dilutions en série ont été effectuées en transférant 500 μ L de la solution d'extrait dans le tube suivant.
- Évaluation de l'inhibition de l'activité de l' α -amylase :
 - ✓ 17 nouveaux tubes ont été préparés.
 - ✓ Chaque tube a reçu : 100 μ L de tampon phosphate salin 100 μ L d'extrait dilué (de l'étape précédente) 100 μ L d' α -amylase
 - ✓ Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 10 minutes.
- Ajout de l'amidon et incubation :
 - 100 μ L de solution d'amidon ont été ajoutés à chaque tube.
 - ✓ Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 30 minutes.

- Arrêt de la réaction et développement de la couleur :

50 µL de HCl (1 M), 100 µL de solution de Lugol et 1 mL d'eau distillée ont été ajoutés à chaque tube.

- Mesure de l'absorbance :

L'intensité de l'absorbance a été mesurée à 580 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis.

Le taux d'inhibition a été calculé selon la méthode de (Righi, N. A et al . 2024) à l'aide de l'équation suivante :

$$I(\%) = \left(\frac{\text{Abs Extract} - \text{Abs Control}}{\text{Abs Extract}} \right) \times 100$$

- ✓ **I(%)** : pourcentage d'inhibition de l'extrait
- ✓ **Abs Extract** : intensité d'absorption de l'extrait
- ✓ **Abs control** : intensité d'absorption du témoin

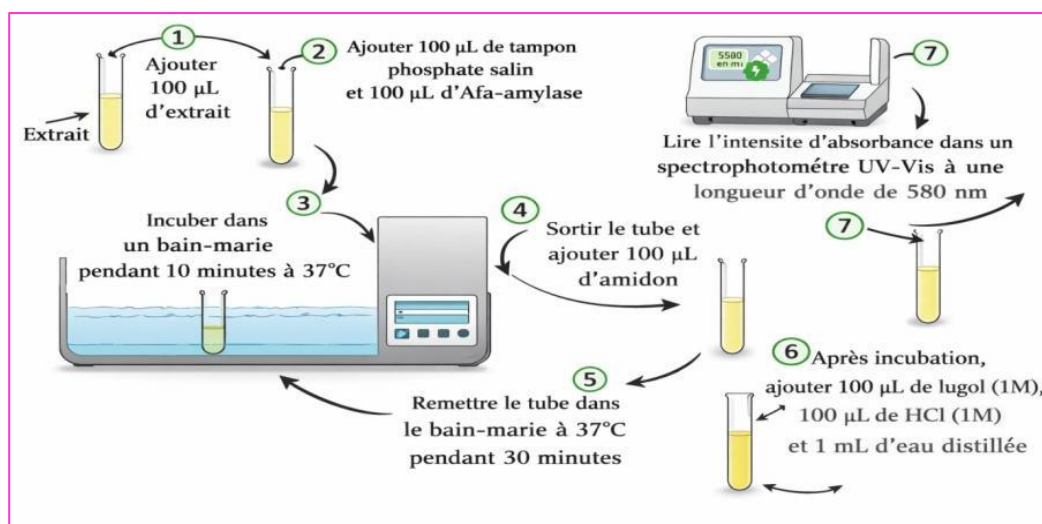


Figure 34: Schéma illustrant le protocole d'évaluation de l'activité antidiabétique

8. Activité phagocytaire

Principe : Le test de phagocytose est basé sur l'activation des cellules phagocytaires par l'extrait phénolique. Il est utilisé pour déterminer l'activité phagocytaire des leucocytes dans l'ingestion de levures *Saccharomyces cerevisiae* après stimulation par un extrait de *Echinopes spinosissimus* (HARUN et al., 2015). La capacité phagocytaire a été calculée en utilisant l'équation appropriée (Benaoun, 2017).

Mode opératoire :

- Prélèvement sanguin :

- ✓ Le sang a été prélevé chez un donneur sain dans un tube contenant de l'héparine, puis centrifugé à 2500 tours/min pendant 10 minutes.

Dans le tube, 1 mg de zinc a été ajouté ainsi que 1 ml d'eau distillée.

- ✓ Les levures et les glucides ont été placés dans un bécher et mélangés avec de l'eau distillée.

- Préparation des extraits :

A. Préparation des tubes expérimentaux :

- ✓ Tube 1 : 5 mg d'extrait dissous dans 100 µl de HBSS.
- ✓ Tube témoin positif (+) : 200 µl de plasma avec 40 µl de zinc.
- ✓ Tube témoin négatif (-) : 200 µl de plasma avec 40 µl de HBSS.

B. Étude de la phagocytose et récupération des cellules phagocytaires :

40 µl de chaque extrait ont été mélangés avec 200 µl de plasma dans les tubes de contrôle positif et négatif, puis incubés sur un agitateur vibrant à 37 °C pendant 30 minutes. Ensuite, 40 µl de solution de levures ont été ajoutés et incubés dans un bain-marie à 37 °C pendant 10 minutes, puis centrifugés à 2500 × g pendant 5 minutes.

- Préparation des lames pour l'observation microscopique :

Quelques gouttes d'extrait ont été déposées sur des lames microscopiques et colorées au bleu de méthylène. Les cellules ont été observées au microscope optique, et le pourcentage de capacité phagocytaire ainsi que l'activité phagocytaire ont été calculés selon la méthode de (Benaoun, F. 2017) à l'aide des deux équations suivantes :

Calcul de la capacité phagocytaire (Phagocytic Capacity) :

$$\text{phagocytic capacity \%} = 100 \times \left(\frac{\text{Number of ingested cells}}{\text{Total number}} \right)$$

- ✓ **CP** : Capacité phagocytaire
- ✓ **Nombre de cellules ingérées** : Nombre de macrophages ayant phagocyté les levures ou le zymosan A
- ✓ **Nombre total** : Nombre de macrophages sélectionnés pour le calcul
- ✓ Calcul de l'activité phagocytaire (Phagocytic Activity) :
- ✓ **Activité phagocytaire** = (CP test - Cp blanc)
- ✓ **AP%** : Activité phagocytaire induite par les polysaccharides ou le témoin positif
- ✓ **CP test %** : Capacité phagocytaire en présence des polysaccharides ou du témoin positif

- ✓ **CP blanc %** : Capacité phagocytaire en l'absence de polysaccharides ou dans le témoin négatif.

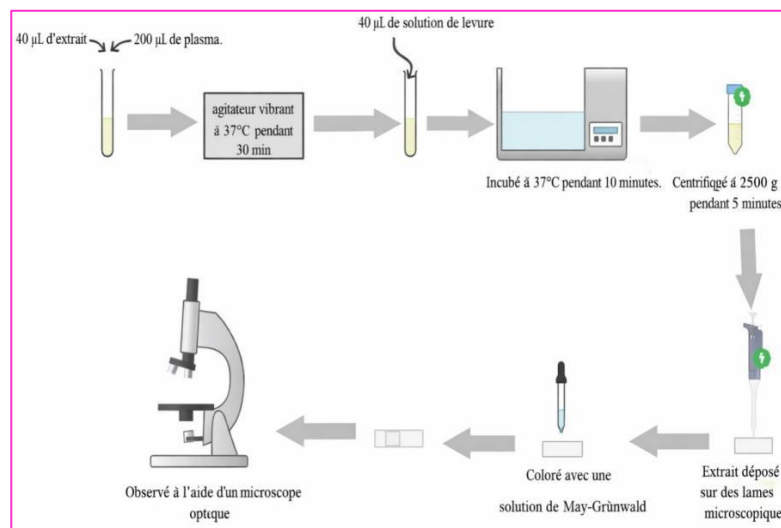


Figure 35: Schéma illustrant le protocole d'étude de l'activité phagocytaire.

9. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire par le test de dénaturation de la BSA

Principe : La dénaturation des protéines, c'est-à-dire la perturbation de leur structure tertiaire et/ou secondaire par des agents chimiques, un stress physique ou l'énergie thermique, entraîne la perte de leur activité biologique. Par conséquent, la dénaturation des protéines tissulaires est considérée comme un biomarqueur des processus inflammatoires. Cette étude a été réalisée selon la méthode décrite par Deshpande et al., avec quelques modifications (Shahina Akhter et al., 2022).

Méthode :

2% de la solution de la BSA a été préparé ensuite, nous avons préparé la solution mère 20mg/ml de tampon a partir de laquelle nous avons préparé les différentes concentrations

- Incubation BSA-Extrait :
- ✓ 20 nouveaux tubes à essai ont été préparés :
- ✓ Chaque tube contenait 50 µL de l'extrait dilué provenant de l'étape précédente et 450 µL de la solution de BSA.
- ✓ Témoin : 450 µL de solution de BSA et 50 µL d'eau distillée.
- ✓ Les tubes ont été incubés dans un bain-marie à 37 °C pendant 20 minutes, puis à 70 °C pendant 20 minutes.

Mesure de l'absorbance :

- ✓ Après incubation, 500 µL de tampon phosphate salin ont été ajoutés à chaque tube.

- ✓ L'intensité de l'absorbance a été mesurée à 255 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Calcul du pourcentage d'inhibition :

$$I(\%) = \left(\frac{\text{Abs Extract} - \text{Abs Control}}{\text{Abs Extract}} \right) \times 100$$

- ✓ **I (%)** : pourcentage d'inhibition de l'extrait
- ✓ **Abs Extrait** : intensité d'absorbance de l'extrait
- ✓ **Abs Contrôle** : intensité d'absorbance du tém

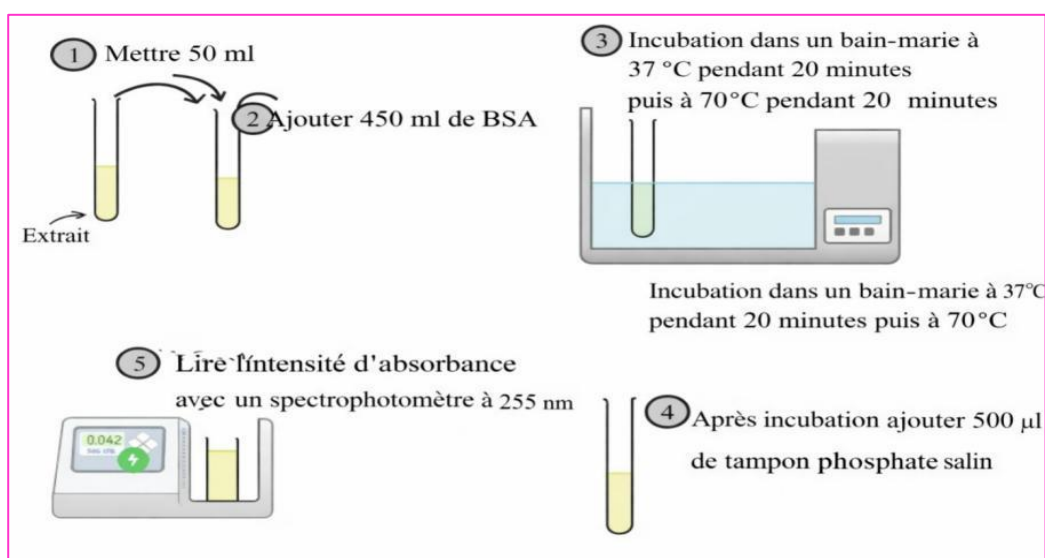


Figure 36: Schéma illustrant le protocole d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire.

9.1.1 Paramètres étudiés

9.1.1.1 Détermination de la CI50 :

Sur la base des résultats expérimentaux, la constante de liaison (K) et le changement d'énergie libre de Gibbs (ΔG) ont été calculés à partir des valeurs d'absorbance des différents extraits. Plus précisément, la constante de liaison a été déterminée spectrophotométriquement à l'aide de l'équation de Benesi-Hildebrand (**Adaika, A. et al., 2019**) :

$$\Delta G = -RT \ln K$$

- ✓ **R** : constante des gaz parfaits, $8,32 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
- ✓ **T** : température absolue, 298 K
- ✓ **K** : constante de liaison, calculée en traçant les valeurs en fonction de $\log 1/[C]$

10 Évaluation de l'activité Anti-ulcère gastrique par test de protection du mucine :
principe:

Le mucilage végétal, riche en polysaccharides hydrophiles, mime la barrière muqueuse

gastrique.

Les agents agressifs (éthanol ou HCl) provoquent une dégradation ou précipitation du mucilage, se traduisant par une diminution de l'absorbance.

10 Préparation du mucilage végétal

Le mucilage de lin a été extrait selon une méthode aqueuse consistant à introduire 10 g de graines dans 100 mL d'eau distillée. Le mélange a ensuite été chauffé à 60 °C pendant 30 minutes sous agitation continue afin de favoriser l'extraction du mucilage. Après chauffage, la préparation a été filtrée à travers une gaze stérile ou un papier filtre, puis centrifugée à 4000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu, correspondant au mucilage brut, a été récupéré et conservé à 4 °C pour une durée maximale de 48 heures. Une solution de travail a ensuite été préparée par dilution du mucilage à une concentration finale de 1 mg/mL dans un tampon phosphate salin (PBS, pH 7,4). Par ailleurs, les extraits végétaux ont été dissous dans le même tampon PBS afin d'obtenir des concentrations finales de 25, 50, 100 et 200 µg/mL.

Méthode et Matériel :

Protocole expérimental :

Une gamme de concentrations a été préparée pour l'extrait d'*Echinopes spinosissimus* (0,2 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 ; 1,5 ; 2 mg/ml) et comparée à différents standards de référence : l'Alginate de Na (25 à 275 mg/ml), l'Antag (40 à 100 mg/ml) et le Lanzoprazole (70 à 175 mg/ml). L'activité protectrice a été estimée par la mesure de la stabilité du mucilage végétal face à des agents agressifs (éthanol ou HCl). Les variations d'absorbance ont été mesurées par spectrophotométrie UV-Visible à 595nm pour quantifier l'intégrité du système mucilagineux.

Calcul de l'activité protectrice :

L'efficacité de la protection est calculée en pourcentage selon la formule suivante :

$$\% \text{ Protection} = [(A \text{ Contrôle} - A \text{ sample}) / A \text{ Contrôle}] \times 100$$

Où :

% Protection : Pourcentage de protection de la barrière mucilagineuse.

A sample : Intensité de l'absorbance mesurée en présence de l'extrait ou des standards.

A Contrôle : Intensité de l'absorbance du Contrôle en condition de stress chimique.

5 Protocole expérimental UV-Vis

Tableau 6: Protocole expérimental UV-Vis

Groupe	Composition
Contrôle normal	Mucilage seul
Contrôle négatif	Mucilage + agent agressif(HCL-ethanol)
Standard	Mucilage + Alginate + agent agressif
Test	Mucilage + extrait + agent agressif

11. Évaluation de l'activité anti-glycation (BSA-glucose):

1 principe:

Le principe repose sur la réaction non enzymatique entre le glucose et la BSA, conduisant à la formation de produits de glycation avancée (AGEs). Ces composés présentent une fluorescence ou une absorbance mesurable à 340 nm. L'activité antiglycation des molécules testées (metformine et quercétine) est évaluée par leur capacité à inhiber la formation de ces produits, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance (**Matsuura et al., 2002**).

Méthode et Matériel:

Protocole expérimental:

L'évaluation de l'activité anti-glycation a été réalisée selon le modèle BSA-Glucose. Le système réactionnel a été préparé en mélangeant de l'albumine sérique bovine (BSA) avec du glucose pour simuler la formation des produits de glycation avancée (AGEs). Pour tester le potentiel inhibiteur, une gamme de concentrations a été préparée pour l'extrait *d'Echinops spinosissimus* et la Metformine (0,2 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,0 ; 1,2 ; 1,5 et 2,0 mg/mL) ainsi que pour la Quercétine (1,0026 ; 1,28 ; 1,6 et 2,0 mg/mL). Ces mélanges ont été soumis à une incubation thermique contrôlée afin de favoriser la réaction de glycation, parallèlement à un tube témoin contenant uniquement le mélange (BSA + Glucose). À la fin de la période d'incubation, l'intensité de la fluorescence a été mesurée par spectrofluorimétrie pour quantifier les AGEs formés.

Calcul de l'activité inhibitrice :

Le degré d'inhibition du processus de glycation, exprimé en pourcentage (%), est calculé pour chaque concentration selon la formule suivante : % Inhibition = [(A Contrôle - A Extrait) / A Contrôle] x 100

Ou :

% Inhibition : Pourcentage d'inhibition de la glycation.

A Extrait : Intensité de la fluorescence mesurée en présence de l'extrait ou des standards.

Contrôle: Intensité de la fluorescence du Contrôle (sans inhibiteur).

12. Évaluation de l'activité de BSA- Extrait

1. Principe

L'étude de l'interaction entre l'extrait végétal et l'albumine sérique bovine (BSA) est réalisée par spectrophotométrie d'absorption UV-Visible. Cette technique repose sur le suivi des variations de l'absorbance de la BSA à 280 nm, longueur d'onde caractéristique des résidus aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine).

Après addition de concentrations croissantes de l'extrait (ligand), les modifications de l'absorbance permettent de mettre en évidence la formation d'un complexe BSA-extrait. Cette interaction se traduit généralement par une variation de l'intensité spectrale, indiquant un changement de l'environnement des chromophores protéiques. L'exploitation des données expérimentales est effectuée selon le modèle de Benesi-Hildebrand, permettant de déterminer les paramètres d'affinité de liaison entre la BSA et les composés actifs de l'extrait (**Lakowicz, 2006**).

2. Mode opératoire

Préparation des solutions

Une solution mère de BSA est préparée à concentration constante dans un tampon phosphate salin (PBS) ajusté à pH 7,4.

Parallèlement, une gamme de solutions de l'extrait est préparée afin d'obtenir des concentrations finales comprises entre 0,1 et 1 mg/mL (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 ; 0,9 et 1 mg/mL). Ces concentrations correspondent aux valeurs utilisées pour l'analyse cinétique (inverses de $1/C$ selon le traitement des résultats).

Procédure expérimentale

Dans une série de tubes à essai, un volume fixe de solution de BSA est mélangé avec des volumes précis de l'extrait, de manière à obtenir différents rapports massiques extrait/protéine variant de 0,1 à 1.

Les mélanges sont ensuite incubés à 37 °C pendant 30 minutes afin de permettre l'établissement de l'équilibre d'interaction entre la protéine et les composés de l'extrait.

Après incubation, les spectres d'absorption sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible dans une plage de 200 à 450 nm. L'absorbance est ensuite mesurée précisément à 280 nm pour chaque échantillon.

Calcul de l'activité inhibitrice :

Calcul du pourcentage d'interaction :

L'efficacité de l'interaction entre l'extrait et la protéine BSA est exprimée en pourcentage selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'interaction} = [(A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon}) / A \text{ contrôle}] \times 100$$

% d'interaction : pourcentage d'interaction (ou variation de l'absorbance) résultant de la formation d'un complexe entre la protéine et les composés actifs.

A échantillon : intensité d'absorbance mesurée pour le mélange (BSA + extrait) à une longueur d'onde de 280 nm.

A contrôle : intensité d'absorbance de la protéine BSA seule dans un tampon phosphate (PBS, pH 7,4) à la même longueur d'onde, représentant l'état de référence de la protéine avant interaction.

B. In silico

1. Activité anti-inflammatoire

1.1. Étude in silico utilisant des méthodes bioinformatiques

1.1.1. Évaluation des paramètres pharmacocinétiques par SwissADME :

Afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire in silico, nous avons d'abord déterminé les paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques des plantes et des médicaments standards étudiés à l'aide de l'outil SwissADME, disponible à l'adresse suivante : (<http://www.swissadme.ch>)(<http://www.swissadme.ch>). À cet effet, les structures des plantes et des médicaments standards ont été obtenues au format SMILES en utilisant l'outil PubChem.

La toxicité de ces composés actifs a ensuite été étudiée à l'aide d'un serveur en ligne (ProTox-II⁶), qui fournit des valeurs prédictives de toxicité, de cytotoxicité, de mutagénicité, de cancérogénicité et d'immunotoxicité. La prédiction des propriétés toxiques des composés étudiés a été réalisée à l'aide des serveurs en ligne PubChem :

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> et ProTox-II : <https://bioinformatics.charite.de/protoxII/>.

A. Formats SMILES

Tableau 7: Formats SMILES et identifiants des molécules testées et des médicaments standards.

Les principes actifs Formats SMILES

Silibine A	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)[C@@H]2[C@H](OC3=C(O2)C=C(C=C3)[C@@H]4[C@H](C(=O)C5=C(C=C(C=C5O4)O)O)O)CO)O</chem>
Silibine B	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)[C@H]2[C@@H](OC3=C(O2)C=C(C=C3)[C@@H]4[C@H](C(=O)C5=C(C=C(C=C5O4)O)O)O)CO)O</chem>
Diclofénac	<chem>C1=CC=C(C(=C1)CC(=O)O)NC2=C(C=CC=C2Cl)Cl</chem>
Prednisolone	<chem>C[C@]12C[C@@H]([C@H]3[C@H]([C@@H]1CC[C@@]2(C(=O)CO)O)CCC4=CC(=O)C=C[C@]34C)O</chem>

1.1.1.1. Informations générales sur une molécule de type médicament :

Pour qu'une molécule devienne un médicament approuvé, elle doit interagir efficacement sur le plan biologique, traiter la pathologie visée, présenter des effets secondaires minimaux et assurer une bonne biodisponibilité. Ces molécules dites « drug-like » possèdent des propriétés ADME incluant une bonne absorption orale, conformément à la règle de Lipinski (Lipinski CA., 2000 ; Lipinski CA et al., 1997). Walters et Murcko ont également contribué à cette définition (Walters WP et al., 2002).

Les molécules de type médicament présentent généralement des caractéristiques chimiques spécifiques et/ou des propriétés physicochimiques similaires à celles des médicaments connus. Notamment, des études menées après des essais cliniques de phase II réussis ont montré que ces molécules (Lipinski., 2004) satisfont au moins trois des critères suivants de Lipinski (Lipinski et al., 1997) :

- ✓Masse moléculaire inférieure à 500 Daltons.
- ✓LogP calculé inférieur à 5.
- ✓Nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène ≤ 10 .
- ✓Nombre de donneurs de liaisons hydrogène ≤ 5 .

Des compléments ont été apportés, notamment par Veber (Youmbai et al., 2021) :

- ✓Nombre de liaisons rotatives (NROT) : $(0 < \text{NROT} < 10)$
- ✓Surface polaire topologique (TPSA) : $(20 < \text{TPSA} < 130)$
- ✓Fraction de carbones hybridés sp^3 (Fraction Csp3) : $(0,25 < \text{Fraction Csp3} < 1)$

✓Solubilité (Log S) : $(-6 < \text{Log S} < 0)$

1.1.2. Étude de docking moléculaire

1.1.2.1. Préparation des principes actifs des extraits et des médicaments

La structure des composés actifs des plantes étudiées ainsi que des médicaments standards a été préparée et optimisée à l'aide du logiciel Gaussian 09, puis enregistrée au format PDB.

1.1.2.2. Macromolécule (cible protéique)

Le test in silico de l'effet anti-inflammatoire des extraits de plantes a été réalisé sur la protéine COX-2.

Les prostaglandines, médiateurs essentiels de l'inflammation, sont générées par l'enzyme prostaglandine synthase (cyclooxygénase) à travers la conversion de l'acide arachidonique en produits tels que PGG₂ (Emon et al., 2021 ; Stachowicz, 2021).

Tableau8: Présentation de la cible 1COX2

	CYCLOOXYGENASE-2	
	ID PDB	6COX
	Résolution (Å)	2.80
	R-value libre (R-free)	0.309
	R-value	0.220
	Groupe spatial	1 2 2 2
	Mutation(s)	No
	Chains	A , B
	Organism(s)	Mus musculus

1.1.2.3. Étude des interactions moléculaires à l'aide d'AutoDock Tools

✓Procédure opératoire

Pour utiliser ce logiciel, les commandes suivantes doivent être exécutées :

File → Preferences → Set puis saisir « ADT » dans « Startup Directory », cliquer sur « Make Default », puis sur « Set ».

De manière générale, le logiciel AutoDock comprend six étapes principales :

A. Chargement du récepteur et du ligand :

Cette étape est réalisée à l'aide des commandes suivantes :

- Ligand → Input → Open → ligand.pdb
- Ligand → Torsion Tree → Detect Root
- Output → Save as pdbqt

B. Préparation de l'accepteur :

Cette étape est réalisée à l'aide des commandes suivantes :

- File → Read Molecule → sélectionner .pdb
- Edit → Delete Water
- Edit → Hydrogens → Add → polar only
- Edit → Hydrogens → Merge Non-Polar
- Edit → Charges → add Kollman charges

C. Configuration des paramètres AutoGrid :

Cette étape est réalisée à l'aide des commandes suivantes :

- Grid → Macromolécule → Choose → sélectionner → write pre.pdbqt → save
- Grid → Set Map Types → Choose Ligand → sélectionner le ligand
- Grid → Grid Box → définir le nombre de points en x, y et z à 50 et régler le Spacing

(angstrom) à 0,200

- Grid → Output → Save GPF → write grid.gpf → save

D. Exécution d'AutoGrid :

Cette étape est réalisée à l'aide des commandes suivantes :

- Run → AutoGrid

E. Exécution d'AutoDock :

Cette étape est réalisée à l'aide des commandes suivantes :

- Docking → Macromolecule → Rigid Filename → sélectionner pre.pdbqt
- Docking → Ligand → Choose → sélectionner le ligand
- Docking → Search Parameters → Genetic Algorithm → définir Number of GA Runs à 25
- Docking → Output → Lamarckian GA (4.2) → enregistrer sous dock.dpf
- Run → AutoDock

F. Analyse des résultats :

Cette étape est réalisée à l'aide des commandes suivantes :

- Analyze → Docking → Open → fichier dock.dlg
- Analyze → Macromolecule → Open
- Analyze → Conformation → Play, Ranked by energy → analyser les interactions
- Write complexepdbqt
- Convertir le fichier com.pdbqt en com.pdb à l'aide de PyMOL
- File → Export molecules as → save

✓Pour obtenir une image 2D :

Ouvrir dans Discovery → Script → Visualization → Publication Quality

- Script → Sélection → Select Ligand → Define Ligand → Ligand Interaction → Show 2D Diagram
- File → Save as → fichier image

✓Pour obtenir une image 3D :

Ouvrir com.pdb dans PLIP → cliquer sur Analyze → enregistrer au format .pse

Tableau 8: Docking parameters selected for cyclooxygenase-2

Centre de la grille			Taille de la grille (Å)		
X	Y	Z			
23.665	23.312	47.826	40	40	40

B. 2. Activité anti-antidiabétiques

2.1. Étude in silico utilisant des méthodes bioinformatiques

2.1.1. Évaluation des paramètres pharmacocinétiques par SwissADME :

Afin d'évaluer l'activité antidiabétique in silico, nous avons tout d'abord déterminé les propriétés physicochimiques et les paramètres pharmacocinétiques des plantes ainsi que des médicaments standards étudiés à l'aide de l'outil SwissADME, disponible à l'adresse suivante : (<http://www.swissadme.ch> ♦). À cet effet, les structures chimiques des composés ont été obtenues au format SMILES à partir de la base de données PubChem.

La toxicité de ces composés actifs a ensuite été évaluée à l'aide du serveur en ligne ProTox-II¹⁶, fournissant des prédictions concernant la toxicité, la cytotoxicité, la mutagénicité,

la cancérogénicité et l'immunotoxicité. Les propriétés toxiques des composés étudiés ont également été estimées à l'aide des plateformes PubChem et ProTox-II.

A. Formats SMILES

Tableau 9: Formats SMILES et identifiants des molécules testées et des médicaments standards.

Les principes actifs		Formats SMILES
1	Silibine A	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)[C@@H]2<u>C@H</u>CO)O</chem>
2	Silibine B	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)[C@@H]2<u>C@@H</u>CO)O</chem>
3	Alpha-amylases	<chem>CC(=O)<u>NC@@HC</u>(=O)<u>NC@@HC</u>(=O)<u>NC@@HC</u>(=O)<u>NC@@HC</u>(=O)<u>NC@@HC</u>(=O)<u>NC@@HC</u>(=O)<u>NC@@HC</u>(=O)<u>NC@@HC</u>(=O)</chem>
4	Acarbose	<chem>OC1C(O)C(O)C(O)C1OC1C(O)C(O)C(C(O)O)O1C1OC(=O)C(O)C(O)C1OC1OC(CO)C(O)C(O)C1O</chem>

1.1.1.1 Informations générales sur une molécule de type médicament :

Pour qu'une molécule soit considérée comme un médicament approuvé, elle doit présenter une activité biologique efficace, traiter la pathologie ciblée, avoir des effets secondaires limités et garantir une bonne biodisponibilité. Ces molécules dites « drug-like » possèdent des propriétés ADME, incluant une bonne absorption orale, conformément à la règle de Lipinski (Lipinski CA., 2000 ; Lipinski CA et al., 1997). Walters et Murcko ont également contribué à cette définition (Walters WP et al., 2002).

Les molécules de type médicament présentent généralement des caractéristiques chimiques et physicochimiques proches de celles des médicaments connus. Des études réalisées après des essais cliniques de phase II ont montré que ces molécules respectent au moins trois des critères de Lipinski suivants :

- ✓ Masse moléculaire < 500 Daltons
- ✓ LogP < 5
- ✓ Nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène ≤ 10
- ✓ Nombre de donneurs de liaisons hydrogène ≤ 5

Des critères complémentaires ont été proposés par Veber :

- ✓ Nombre de liaisons rotatives (NROT) : $0 < \text{NROT} < 10$
- ✓ Surface polaire topologique (TPSA) : $20 < \text{TPSA} < 130$
- ✓ Fraction de carbones hybridés sp^3 : $0,25 < \text{Fraction Csp}^3 < 1$
- ✓ Solubilité (Log S) : $-6 < \text{Log S} < 0$

1.1.2. Étude de docking moléculaire

1.1.2.1. Préparation des composés actifs des extraits et des médicaments

Les structures des composés actifs des plantes étudiées ainsi que des médicaments standards ont été préparées et optimisées à l'aide du logiciel Gaussian 09, puis enregistrées au format PDB.

1.1.2.2. Macromolécule (cible protéique)

Le test *in silico* de l'activité antidiabétique des extraits végétaux a été réalisé sur l'enzyme α -amylase.

L' α -amylase est une enzyme clé impliquée dans le métabolisme des glucides, responsable de l'hydrolyse de l'amidon en sucres simples. Son inhibition permet de réduire l'absorption du glucose et de contrôler l'hyperglycémie, ce qui en fait une cible thérapeutique importante dans le traitement du diabète.

Tableau 10: Présentation de la cible 1OSE α -amylase



Alpha Amylases	
ID PDB	1OSE
Résolution (Å)	2.00
R-value libe (R-free)	0.25
R-value	0.20
Groupe spaial	P212121
Mutation(s)	No
Chains	A
Organism(s)	Homo Sapiens (pancréatique)

"Le protocole d'étude in silico relatif à l'activité anti-diabétique est rigoureusement identique à l'approche méthodologique adoptée pour l'activité anti-inflammatoire

Tableau 11: Docking parameters selected for Alpha Amylases

Centre de la grille			Taille de la grille (Å)		
X	Y	Z			
23.665	23.312	47.826	40	40	40

Chapitre II:

Résultats et discussion

I. In vitro**1. Rendement d'extraction :**

Le rendement d'extraction (R %) est défini quantitativement comme le rapport entre la masse de l'extrait sec (M extrait), récupérée après l'évaporation du solvant, et la masse initiale du matériel végétal (M plante) utilisée pour l'extraction.

$$R\% = \left(\frac{M_e}{M_v} \right) \times 100$$

- ✓ Poids du flacon sans couvercle (vide) : 9,973 g
- ✓ Poids du flacon vide avec couvercle : 11,731 g
- ✓ Poids du flacon contenant l'extrait sans couvercle : 15,855 g
- ✓ Poids du flacon contenant l'extrait avec couvercle : 17,616 g

$$R\% = \left(\frac{15,855}{100} \right) \times 100$$

Tableau 12: Rendement de l'extrait aqueux de Echinops spinosissimus.

Rendement d'extraction(R %)	Couleur	Aspect	Extrait
15,855	Brun	Poudre	Liquide

2. Criblage phytochimique

Dans cette analyse, les composés secondaires d'origine végétale ont été évalués. Ceux-ci comprennent une variété de classes structurales, parmi lesquelles les alcaloïdes, les tanins, les stéroïdes, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les polyphénols, les glycosides cardiaques, les saponines, les quinones libres et les coumarines.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 13: Résultats des tests du criblage phytochimique.

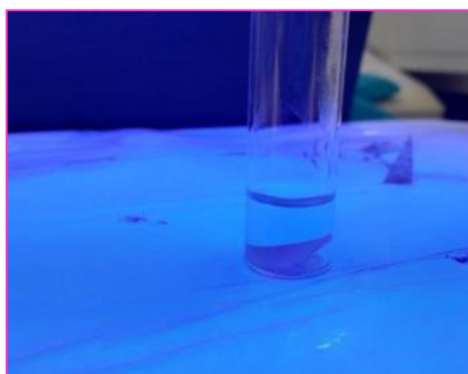
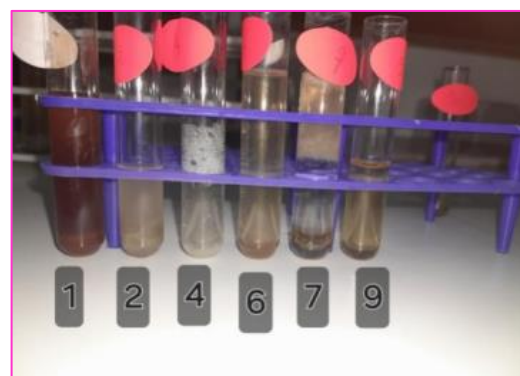
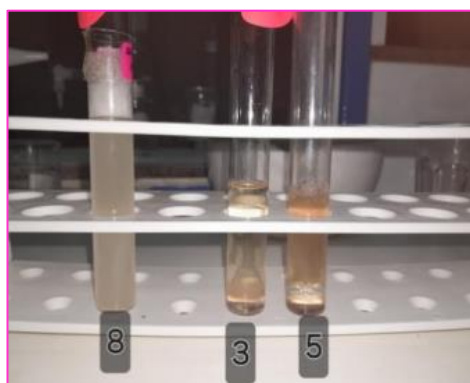
Test	Résultat
Alcaloïdes	+++
Tanins	+++
Stéroïdes	++

Flavonoïdes	+++
Terpénoïdes	+++
Polyphénols	+
Glycosides	+++
Saponin	+++
Quinones libres	+
Coumarines: Fluorescence sous UV	+++

(-): Absence (+): Traces (++) : Positif (+++) : Très positif

Test des saponosides (test de mousse)

- Si la hauteur de la mousse est $< 1 \text{ cm}$: résultat négatif.
- Si la hauteur de la mousse est $\geq 1 \text{ cm}$: résultat positif.



3. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

3.1. Évaluation de la teneur en polyphénols

La teneur totale en polyphénols a été déterminée à l'aide du test colorimétrique de Folin-Ciocalteu, en utilisant l'acide gallique comme standard de référence. L'absorbance a été mesurée à 760 nm.

L'équation de la droite d'étalonnage a été utilisée pour déterminer les quantités de polyphénols dans l'extrait correspondant, lesquelles ont été exprimées en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g):

Tableau 14: Équation linéaire de la courbe d'intensité d'absorbance de l'acide gallique à différentes concentrations.

Composant	équation	R ²
Galic acid	$Y = 3.714x - 0.0914$	0.9951

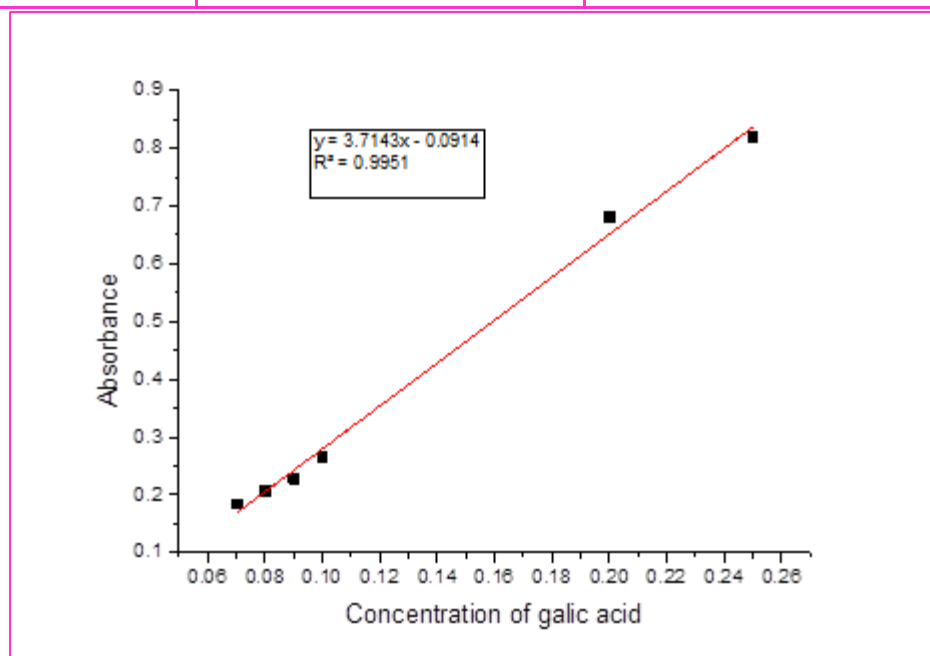


Figure 37: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Tableau 15: Quantité totale de polyphénols

Concentration (mg/ml)	Teneur en polyphénols (mg EAG/g)
1	92,543± 0.002

Les résultats indiquent que l'extrait de *Echinops spinosissimus* contient une teneur élevée en polyphénols, soit 92,543 mg EAG/g

3.2. Évaluation de la teneur en flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes a été quantifiée à l'aide du test colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3), en utilisant la rutine comme standard de référence.

Les mesures d'absorbance ont été effectuées à une longueur d'onde de 430 nm.

Les données obtenues sont présentées dans les tableaux suivants, accompagnées de l'équation de quantification correspondante:

Tableau 16: Équation linéaire de l'intensité d'absorbance de la rutine à différentes concentrations.

Composant	Équation	R^2
Rutin	$Y = 11.787x + 0.0991$	0.9912

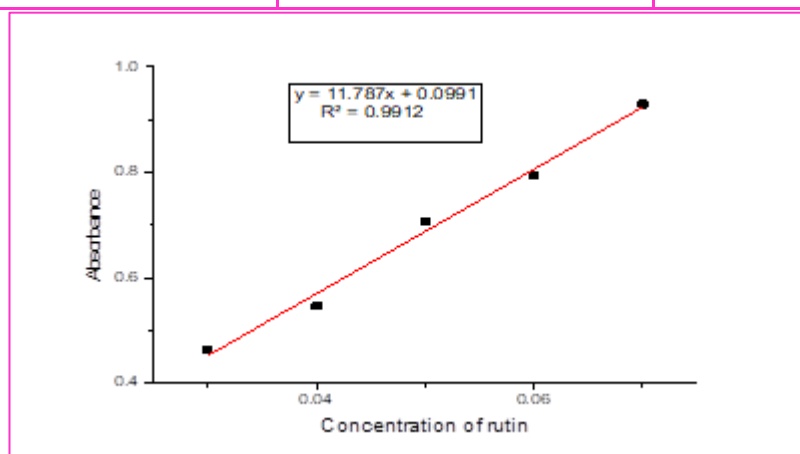


Figure 38: Courbe d'étalonnage de la rutine

Tableau 17: Quantité totale de flavonoïdes

Concentration (mg/ml)	Dosage de la teneur en flavonoïdes (mg RE/g)
2	1,862± 0.001

La quantification des flavonoïdes dans l'extrait de *Echinops spinosissimus* a révélé une teneur estimée à 1,862 mg RE/g.

4. Évaluation de l'activité antioxydante par la méthode UV-visible

4.1. Méthode de piégeage des radicaux libres (test DPPH) :

La capacité de l'extrait à neutraliser les radicaux libres a été évaluée en utilisant la méthode DPPH, l'acide ascorbique servant de référence.

L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 517 nm.

Les résultats ont été représentés sous forme de courbe montrant la relation entre la concentration et le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH, décrite par l'équation suivante :

Tableau 18: Taux d'inhibition de l'extrait de *Echinops spinosissimus* sur les radicaux libres en fonction de la concentration.

Concentration (mg/ml)	Absorbance moyenne	Taux d'inhibition (%)
0.6	0,586	56,485
0.4	0,686	49,034
0.3	0,661	50,866
0.2	0,707	47,5
0.1	0,767	43,044

4.2. Détermination de la CI_{50} :

Tableau 19: Équation lineaire de la courbe de l'extrait de *Echinops spinosissimus* et de l'acide ascorbique

Composants	Équation	R^2
Acide ascorbique	$Y = 11274x - 28.616$	0.9915
Extrait	$Y = 25.618x + 41.788$	0.930

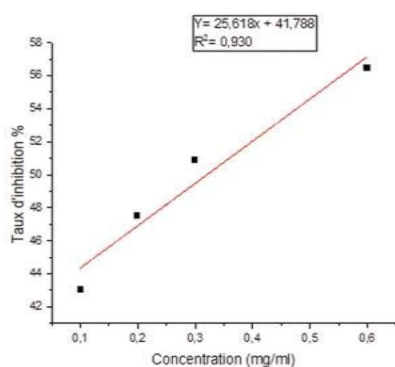


Figure 39: Courbe d'étalonnage de l'extrait.

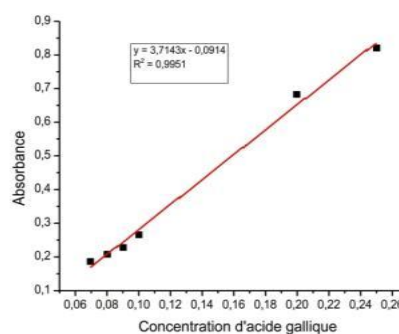


Figure 40: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

--	--

Tableau 20: Valeurs de la concentration inhibitrice moyenne de l'extrait de *Echinops spinosissimus* et de l'acide ascorbique.

Composants	IC50 (mg/ml)
Acide ascorbique	0.0069
Extrait	0,320

Les résultats ont montré que la valeur de CI_{50} de l'extrait de *Echinops spinosissimus* (0,320 mg/mL) était supérieure à celle de l'acide ascorbique (0,0069 mg/mL). Cela suggère que l'extrait présente une activité antioxydante deux fois moindre comparée à celle de l'acide ascorbique.

5. Évaluation de l'activité antibactérienne in vitro

L'activité antibactérienne des substances actives dérivées de l'extrait a été évaluée à l'aide du test de zone d'inhibition. Cette méthode a permis d'évaluer le potentiel de ces substances à exercer un effet thérapeutique antibactérien, l'amoxicilline servant de contrôle positif.

Tableau 21: Résultats du test d'inhibition à différentes concentrations des espèces bactériennes testées.

C (mg/ml)	Types de souches bactériennes testées											
	E.coli		K.Pseudomonas		P.aeruginosa		E. faecalis		B. subtilis		S. aureus	
	Diamètre	I%	Diamètre	I%	Diamètre	I%	Diamètre	I%	Diamètre	I%	Diamètre	I%
20	10	58.33	9	62.5	14	41.66	6	75	15	37.5	10	58.33
10	6	75	8	66.66	12	50	6	75	9	62.5	8	66.66
5	6	75	7	70.83	10	58.33	0	/	9	62.5	8	66.66
2.5	6	75	6	75	9	62.5	0	/	8	66.66	7	70.83
1.25	6	75	6	75	9	62.5	0	/	8	66.66	7	70.83
0,625	6	75	6	75	9	62.5	0	/	7	70.83	6	75
0,3125	5	79.16	6	75	7	70.83	0	/	0	100	0	/
Amoxicillin	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-

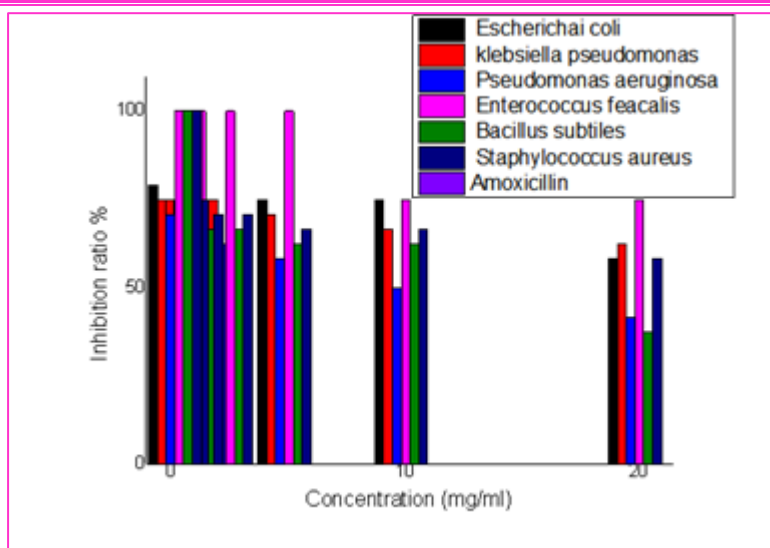


Figure 41: Pourcentage d'inhibition de l'activité bactérienne par l'extrait

Le diamètre des zones d'inhibition variait de 5 mm à 10 mm, tandis que le témoin positif (**Amoxicilline**) présentait une zone d'inhibition de 24 mm. La zone d'inhibition maximale (10 mm) a été observée pour l'extrait à une concentration de 20 mg/mL, et la zone d'inhibition minimale (5 mm) a été observée pour l'extrait à une concentration de 0,3125 mg/mL.

Klebsiella pneumoniae (Kp) :

Le diamètre des zones d'inhibition variait de 6 mm à 9 mm, tandis que le témoin positif (**Amoxicilline**) présentait une zone d'inhibition de 24 mm. La zone d'inhibition maximale (9 mm) a été observée pour l'extrait à une concentration de 20 mg/mL, et la zone d'inhibition minimale (6 mm) a été observée pour l'extrait à une concentration de 0,3125 mg/mL.

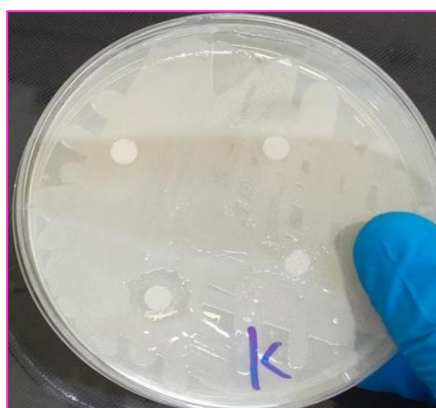


Figure 42: Taille du diamètre d'inhibition de l'extrait de *Echinops spinosissimus* et du témoin positif amoxicilline sur la bactérie *Klebsiella pneumoniae*.

- *Pseudomonas aeruginosa* (PA) :

Le diamètre des zones d'inhibition variait de 7 mm à 14 mm, tandis que le témoin positif (**Amoxicilline**) présentait une zone d'inhibition de 24 mm. La zone d'inhibition

Chapitre II: Résultats et discussion

maximale (14 mm) a été observée pour l'extrait à une concentration de 20 mg/mL, et la zone d'inhibition minimale (7 mm) a été observée pour l'extrait à une concentration de 0,3125 mg/mL.

- *Enterococcus faecalis* (EF) :

Le diamètre des zones d'inhibition variait de 0 mm à 6 mm, tandis que le témoin positif (Amoxicilline) présentait une zone d'inhibition de 24 mm. La zone d'inhibition maximale (6 mm) a été observée pour l'extrait à une concentration de 20 mg/mL, et la zone d'inhibition minimale (0 mm) a été observée pour l'extrait à une concentration de 0,3125 mg/mL.



Figure 43: Taille du diamètre d'inhibition de l'extrait de *Echinops spinosissimus* et du témoin positif amoxicilline sur la bactérie *Enterococcus faecalis*.

- *Bacillus subtilis* (BS) :

Le diamètre des zones d'inhibition variait de 0 mm à 15 mm, tandis que le témoin positif (**Amoxicilline**) présentait une zone d'inhibition de 24 mm. La zone d'inhibition maximale (15 mm) a été observée pour l'extrait à une concentration de 20 mg/mL, et la zone d'inhibition minimale (0 mm) a été observée pour l'extrait à une concentration de 0,3125 mg/mL.

- *Staphylococcus aureus* (SA) :

Le diamètre des zones d'inhibition variait de 0 mm à 10 mm, tandis que le témoin positif (**Amoxicilline**) présentait une zone d'inhibition de 24 mm. La zone d'inhibition maximale (10 mm) a été observée pour l'extrait à une concentration de 20 mg/mL, et la zone d'inhibition minimale (0 mm) a été observée pour l'extrait à une concentration de 0,3125 mg/mL.

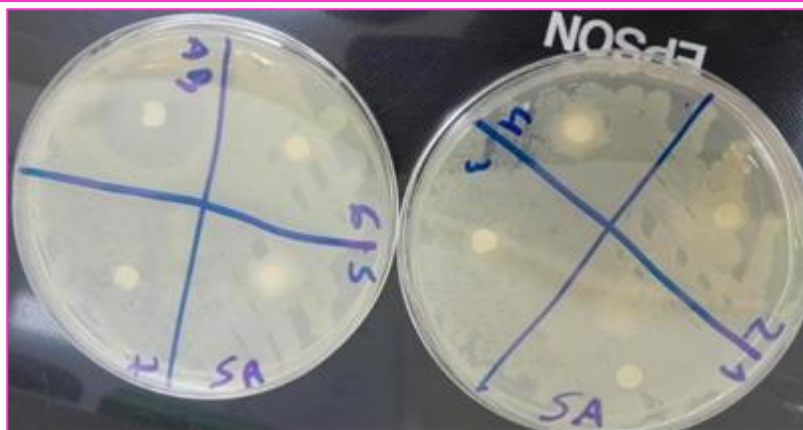


Figure 44: Taille du diamètre d'inhibition de l'extrait de *Echinops spinosissimus* et du témoin positif amoxicilline sur la bactérie *Staphylococcus aureus*.

5.1. Détermination de la CI_{50}

Tableau 22 Détermination de la CI_{50}

IC50	R2	Équation	Bactérie
30,454	0,96325	$Y = 74,322 - 0,7986 * X$	<i>Staphylococcus aureus</i>
12,561	0,99861	$Y = 71,294 - 1,695 * X$	<i>Bacillus subtilis</i>
11,842	0,9663	$Y = 63,313 - 1,124 * X$	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
27,887	0,99683	$Y = 79,870 - 1,0711 * X$	<i>Escherichia coli</i>
40,025	0,97863	$Y = 74,638 - 0,615 * X$	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
			<i>Enterococcus faecalis</i>

6. Évaluation de l'activité antidiabétique

L'effet de l'extrait en tant qu'inhibiteur de l'enzyme alpha-amylase a été évalué à l'aide de la méthode du test d'inhibition de l'amylase, dans laquelle l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 580 nm, en utilisant l'acarbose comme référence positive. Les résultats sont présentés dans la courbe ci-dessous :

Tableau 23: Résultats du taux d'inhibition de l'extrait de *Echinops spinosissimus* sur l'activité de l'enzyme alpha-amylase à différentes concentrations.

Concentration (mg/mL)	Absorbance (580 nm)	Taux d'inhibition (%)
20	1,607	86,558
10	0,95	77,263
5	0,797	72,898
2.5	0,552	60,869
1,25	0,489	55,828
0,625	0,428	49,532

Chapitre II: Résultats et discussion

0,313	0,367	41,144
0,156	0,352	38,636
0,078	0,338	36,094
0.0339	0,314	31,210
0.02	0,312	30,769
0.01	0,306	29,411
0.005	0,26	16,923
0.002	0,247	12,550
0.001	0,205	-5,365

Tableau 24: Équation exponentielle des résultats de l'évaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait de *Echinops spinosissimus* et du contrôle de référence acarbose.

Composants	Équation	R ²
Acarbose	$Y = 91,043 - 81,317 \cdot \exp(-3,594X)$	0.990
Extrait	$Y = 81.187 - 48.069 \cdot \exp(-0.428X)$	0.961

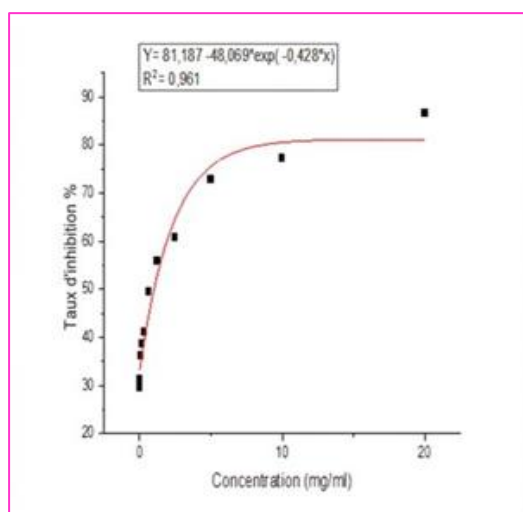


Figure 45: Courbe du pourcentage d'inhibition de l'activité antidiabétique par l'extrait

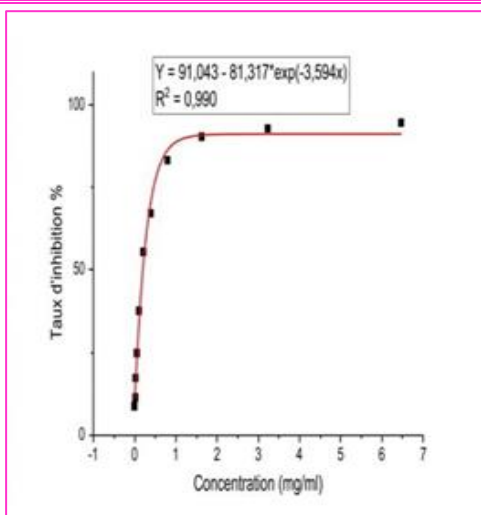


Figure 46: Courbe du pourcentage d'inhibition de l'activité antidiabétique par l'acarbose

Tableau 25: Valeurs de la concentration inhibitrice moyenne de l'extrait de *Echinops spinosissimus* et de l'acarbose.

Composants	IC50 (mg/ml)
Acarbose	0.1902
Extrait	0,0983

La comparaison avec le témoin positif acarbose a révélé que l'extrait de la plante *Echinops spinosissimus* présentait une activité antidiabétique légèrement inférieure, avec des valeurs de CI_{50} de 0,0983 mg/mL pour l'extrait et 0,1902 mg/mL pour l'acarbose.

6.2 Détermination de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) et du coefficient de liaison K

Tableau 26: Rapports d'Acarbose $A_0/(A-A_0)$ et $1/C$ (M^{-1}) de l'extrait d'*Echinops spinosissimus*

Concentration (mg/mL)	1/c	A/A0-A
0,1	10	-8,51543
0,4	2,5	-2,02347
0,5	2	-1,52232
0,6	1,66667	-1,44513
0,7	1,42857	-1,39378
0,8	1,25	-1,33242
0,9	1,11111	-1,29422
1	1	-1,28129

Tableau 27: Rapports d'absorption $A_0/(A-A_0)$ et $1/C$ (M^{-1}) du Acarbose

Chapitre II: Résultats et discussion

Concentration (mg/mL)	A0/A-A0	1/C
0,02676	-1,06707	24,122
0,01338	-1,11896	48,244
0,00669	-1,14511	96,488
0,00334	-1,22395	192,976

Tableau 28: Équation de régression linéaire des résultats de l'évaluation de l'activité anti-diabétique relative à l'extrait d'*Echinops spinosissimus* et à la référence standard : l'Acarbose.

Composants	Équation	R2
Acarbose	$Y = -8,585x - 1,061$	0,96
Extrait	$Y = -0,82x - 0,189$	0,99

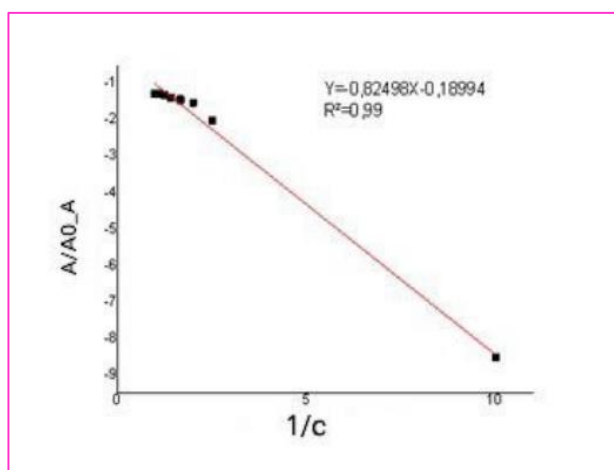


Figure 47: Droite de $A_0 / (A - A_0)$ en fonction de $1 / [\text{Extrait}]$.

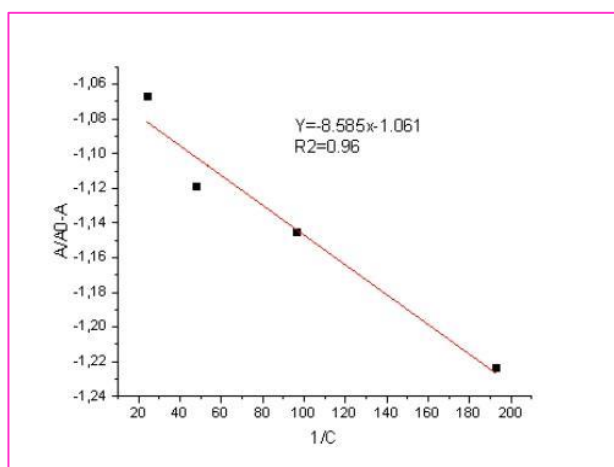


Figure 48: Droite de $A_0 / (A - A_0)$ en fonction de $1 / [\text{Acarbose}]$.

Tableau 29 Valeurs du coefficient de liaison (K) et de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) pour l'extrait d'*Echinops spinosissimus*, le Acarbose

Composants	K (M ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
Acarbose	6,9078	-21,9186
Extrait	1,442	-18,03

Selon les valeurs ΔG de l'énergie libre de liaison, nous observons que l'extrait de la plante *Echinops spinosissimus* (ΔG : -18,03) a une affinité significative pour le médicament Acarbose (ΔG : -21,9186), ce qui suggère qu'il pourrait posséder des propriétés similaires aux inhibiteurs de l'alpha-amylase (agents anti-diabétiques).

7. Évaluation de l'activité phagocytaire

Ce test in vitro évalue le potentiel des substances à moduler l'activité phagocytaire des cellules immunitaires. La phagocytose, un processus crucial pour la défense de l'organisme contre les agents pathogènes, a été quantifiée dans cette étude.

7.1. Capacité phagocytaire (%) :

Tableau 30: Résultats du pourcentage de capacité phagocytaire de l'extrait de *Echinops spinosissimus* à différentes concentrations.

Concentration (mg/ml)	Capacité phagocytaire (%)
5	20
2.5	8,2802
1,25	7,3770
0,625	3,3613

7.1.1. Détermination de la CI₅₀ :

Tableau 31: Équation linéaire de la courbe des résultats de la capacité phagocytaire relative à l'extrait de *Echinops spinosissimus*.

Composants	Équation	R ²
Extract	Y= - 1.287+3.612X	0.930

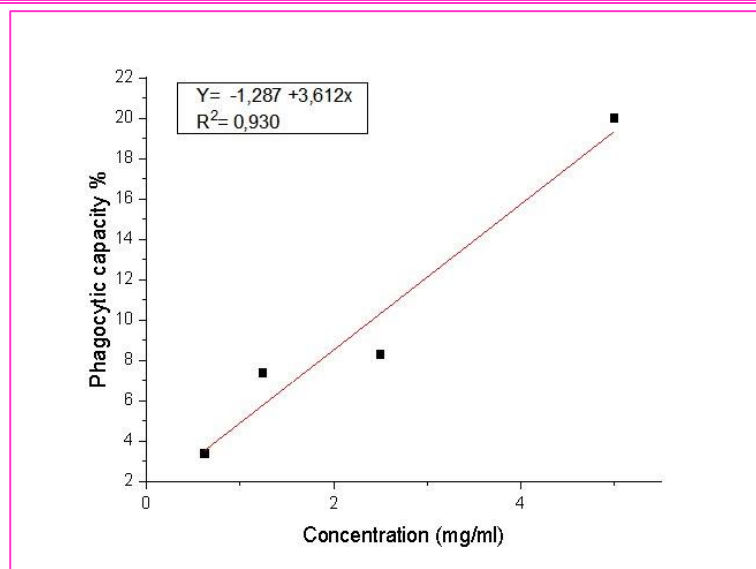


Figure 49: Pourcentage de la capacité phagocytaire de l'extrait

Tableau 32: Valeurs de la concentration inhibitrice moyenne de l'extrait de *Echinops spinosissimus*.

Composants	IC50 (mg/ml)
Extrait	1.42

Cette étude examine la stimulation dose-dépendante de la phagocytose par l'extrait de la plante *Echinops spinosissimus*. La CI_{50} pour la stimulation de la phagocytose a été déterminée à 1,42 mg/mL, et la capacité phagocytaire a été observée augmenter avec l'augmentation de la concentration, atteignant 20 % à une dose de 5 mg/mL. Les résultats de la capacité phagocytaire de l'extrait dépassent ceux du témoin (zinc), qui est mesuré à 1 %.

7.2. Activité phagocytaire :

Tableau 33: Résultats du pourcentage de l'activité phagocytaire de l'extrait de

Concentration (mg/ml)	Activité phagocytaire
5	17
2.5	5,2802
1,25	4,3770
0,625	0,3613

7.2.1. Détermination de la CI_{50} :

Tableau 34: Équation linéaire de la courbe des résultats de l'activité phagocytaire relative à l'extrait de *Echinops spinosissimus*.

composante	Équation	R2
------------	----------	----

Chapitre II: Résultats et discussion

Extrait	$Y = -1,71 + 3,61 X$	0.930
---------	----------------------	-------

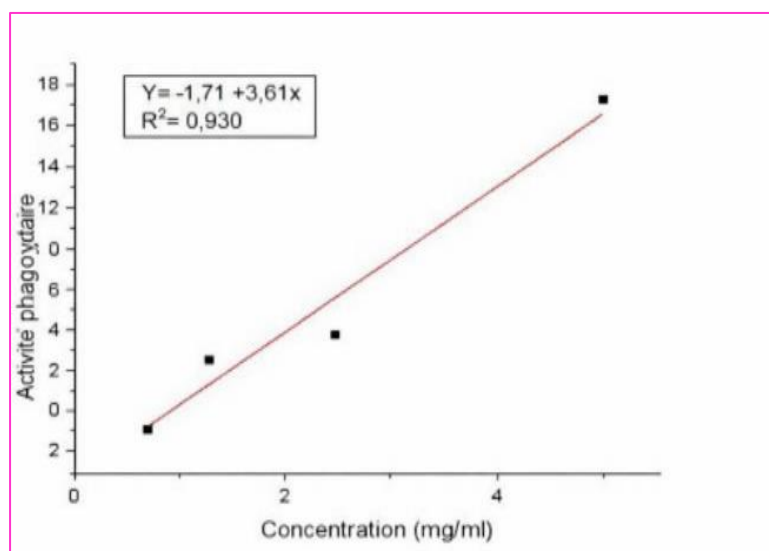


Figure 50: Courbe de l'activité phagocytaire par l'extrait

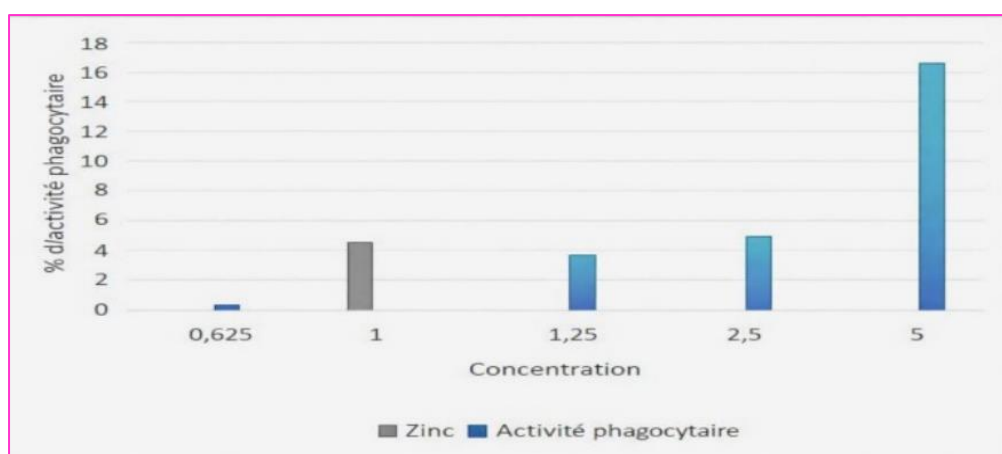


Tableau 35 : Valeurs de la concentration inhibitrice moyenne de l'extrait de *Echinops spinosissimus*

composante	IC50 (mg/ml)
Extrait	13.37

L'effet de l'extrait d'*Echinops spinosissimus* sur la stimulation de l'activité phagocytaire a été étudié de manière dose-dépendante. La valeur de l'IC₅₀ a été déterminée à 13,37 mg/mL, tandis que la réponse phagocytaire a atteint 17 % à la concentration de 5

Chapitre II: Résultats et discussion

mg/mL. Les résultats de l'activité phagocytaire de l'extrait dépassent ceux du témoin (zinc), pour lequel un pourcentage de 5 % a été enregistré.

8-Évaluation de l'activité anti-inflammatoire par le test de dénaturation de la BSA:

Cette étude in vitro suggère une activité anti-inflammatoire potentielle, étant donné que l'inhibition de la dénaturation des protéines est associée à la suppression des processus inflammatoires. L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par le test de dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA), en utilisant le Diclofénac comme référence standard, et les mesures d'absorbance ont été réalisées à une longueur d'onde de 255 nm.

8.1.Détermination de l'absorbance

Tableau 36: Résultats du pourcentage d'inhibition de l'extrait d'*Echinops spinosissimus* relatif à l'activité anti-inflammatoire en fonction des différentes concentrations.

Concentration	Absorbance (250 nm)	Taux d'inhibition (%)
20	3,316	80,3377
10	2,215	70,5643
5	1,742	62,5717
2,5	1,543	57,7446
1,25	1,17	44,2735
0,625	1,168	44,1780
0,313	1,081	39,6854
0,156	1,059	38,4324
0,078	1,049	37,8455
0.0339	1,042	37,4280
0.02	1,029	36,6375
0.01	1,026	36,4522
0.005	0,98	33,4693
0.002	0,979	33,4014
0.001	0,974	33,0595

8.1.1 Détermination de l'IC₅₀

Tableau 37: Équation exponentielle des résultats de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire relative à l'extrait d'*Echinops spinosissimus* et aux références standards : l'Acarbose, le Diclofénac et la Prednisolone.

Chapitre II: Résultats et discussion

Composants	Équation exponentielle	R ²
Diclofénac	$Y = 62,6526 - 56,0743 \cdot \exp(-25,6637 \cdot x)$	0.9284
Prednisolone	$Y = 57,0238 - 136,6841 \cdot \exp(-62,0619 \cdot x)$	0.95823
Extrait $Y = 80,659 - 44,287 \cdot \exp(-0,171X)$	$Y = 80,659 - 44,287 \cdot \exp(-0,171X)$	0.983

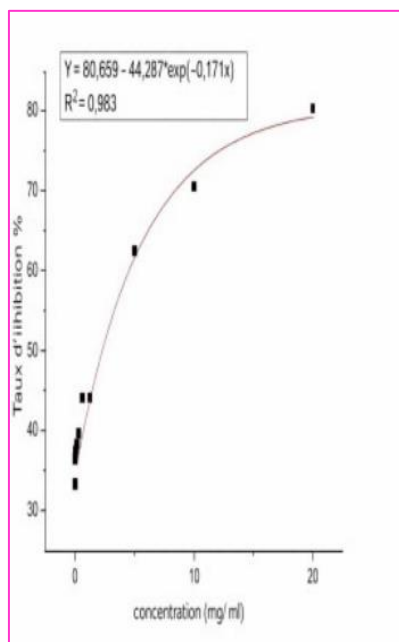


Figure 51: Courbe du taux d'inhibition de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait

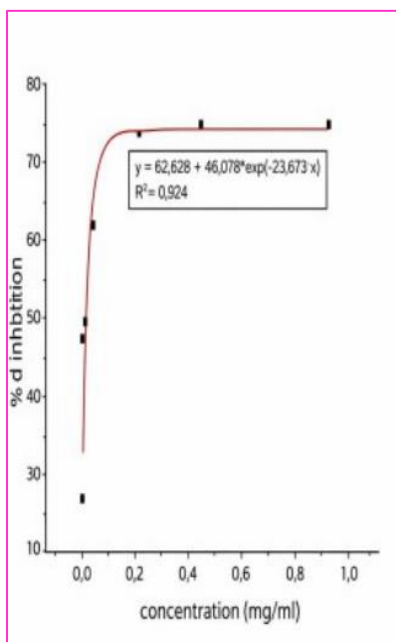


Figure 52: Courbe du taux d'inhibition de l'activité anti inflammatoire du Diclofénac

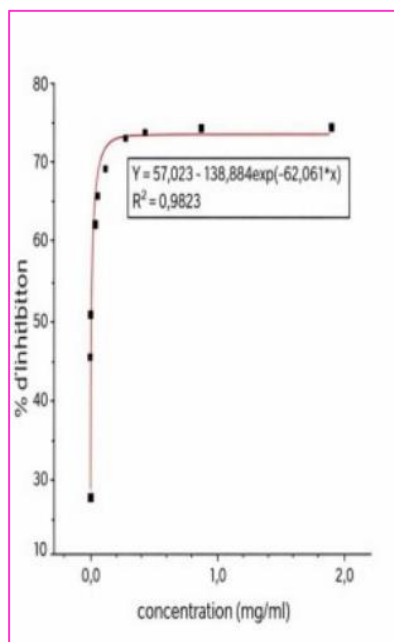


Figure 53: Courbe du taux d'inhibition de l'activité anti-inflammatoire de la Prednisolone

Tableau 38: Valeurs de la concentration inhibitrice moyenne (IC₅₀) de l'extrait d'*Echinops spinosissimus* et des références standards : Diclofénac et Prednisolone.

Composants :	IC ₅₀ (mg/ml)
Diclofénac	0.0580
Prednisolone	0.0478
Extrait	2,1474

Lors de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, l'extrait d'*Echinops spinosissimus* a montré une activité inférieure à celle des témoins positifs, le Diclofénac et la Prednisolone. Les valeurs de l'IC₅₀ étaient de 2,1474 mg/mL pour l'extrait d'*Echinops spinosissimus*, de 2,5496 mg/mL pour le Diclofénac et de 2,663 mg/mL pour la Prednisolone.

8.1.2. Comparaison de l'extrait avec les standards Prednisolone et Diclofénac

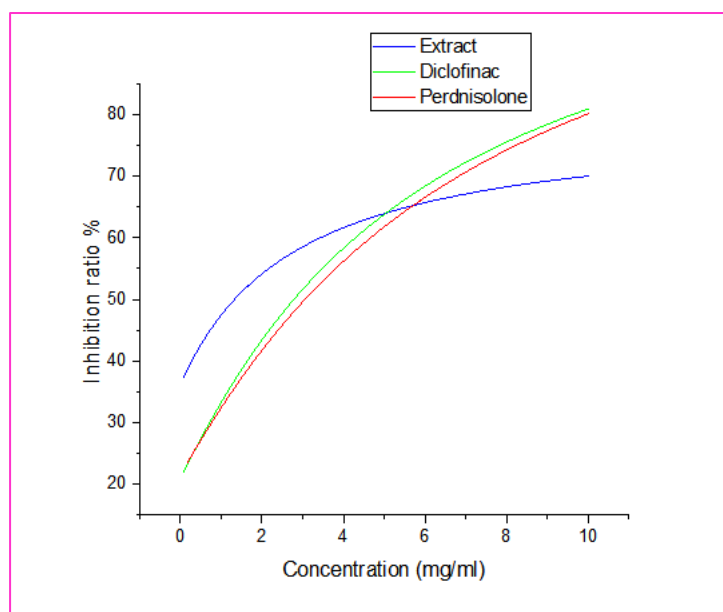


Figure 54: Courbe de l'extrait phénolique d'*Echinops spinosissimus* comparée à celles du Diclofénac et de la Prednisolone

La courbe représente l'extrait phénolique de la plante, étudié en faisant réagir différentes concentrations de l'extrait et des médicaments standards avec l'albumine sérique bovine (BSA). Les résultats montrent que l'extrait a donné des valeurs proches de celles des médicaments standards étudiés.

8.2 Détermination de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) et du coefficient de liaison K

Tableau 39: Rapports d'absorption $A_0/(A-A_0)$ et $1/C$ (M^{-1}) de l'extrait d'*Echinops spinosissimus*

Concentration (mg/mL)	$A_0/(A-A_0)$	$1/C$
10	-1,4171	48,2409
5	-1,5981	96,4818
2,5	-1,7317	192,9630
1,25	-2,2586	385,9260

Tableau 40: Rapports d'absorption $A_0/(A-A_0)$ et $1/C$ (M^{-1}) du Diclofénac

Chapitre II: Résultats et discussion

Concentration (mg/mL)	A0/A-A0	1/C
0,008	-1,576	118,459
0,004	-1,613	236,918
0,001	-2,047	947,673
0,0005	-2,981	1895,347

Tableau 41: Rapports d'absorption $A_0/(A-A_0)$ et $1/C$ (M^{-1}) de la Prednisolone

Concentration (mg/mL)	A0/A-A0	1/C
0,005	-1,561	180,222

0,002	-1,643	360,444
0,001	-1,670	720,888
0,0006	-1,729	1441,776
0,0003	-1,964	2883,552
0,0001	-2,265	5767,104
8,66986E-05	-10,138	11534,208

Composants	Équation	R2
Diclofénac	$Y = -7.9325E-4x - 1.406$	0.973
Prednisolone	$Y = -1.22486E-4x - 1.574$	0.985
Extrait	$Y = -1,31599 - 0,00241x$	0.979

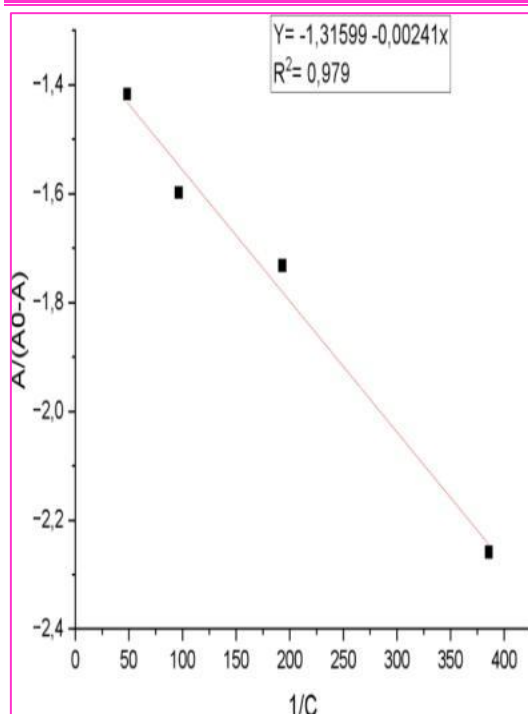


Figure 55: Droite de $A_0 / (A - A_0)$ en fonction de $1 /$ [Extrait].

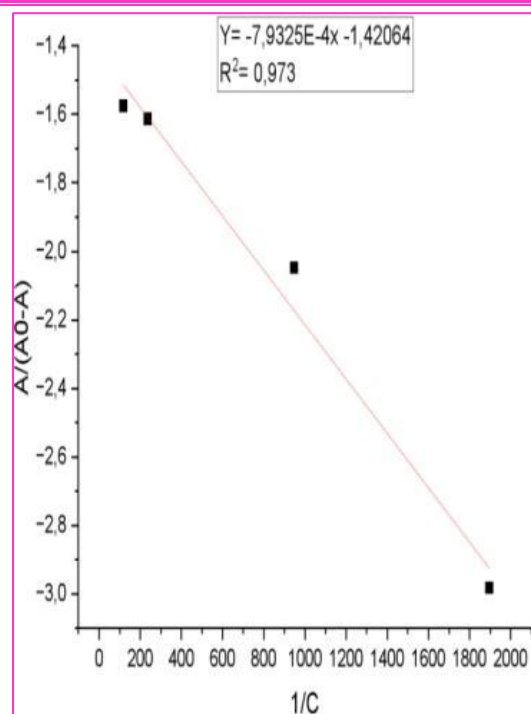


Figure 56: Droite de $A_0 / (A - A_0)$ en fonction d [Diclofénac].

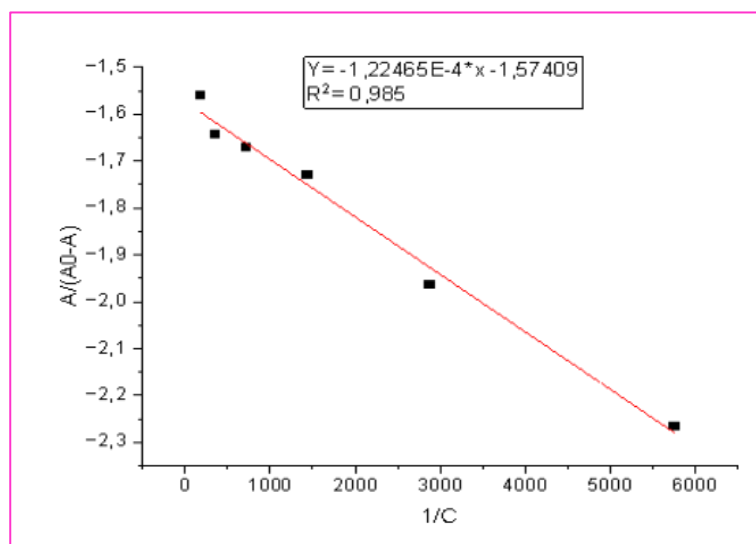


Figure 57: Droite de $A_0 / (A - A_0)$ en fonction de $1 /$ [Prednisolone].

Tableau 42: Valeurs du coefficient de liaison (K) et de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) pour l'extrait d'*Echinops spinosissimus*, le Diclofénac et la Prednisolone.

Composants	K (M-1)	$\Delta G(KJ.mol^{-1})$
Diclofénac	835.046	-16.67
Prednisolone	12835.386	-23.45
Extrait	546.053	-15.154

✓ Selon les valeurs ΔG de l'énergie libre de liaison, nous observons que

l'extrait de la plante *Echinops spinosissimus* ΔG :-15,154 a une affinité significative pour le médicament diclofénac ΔG :-16,67, ce qui suggère qu'il pourrait posséder des propriétés similaires aux anti-inflammatoires non stéroïdiens.

9.Évaluation de l'activité anti-ulcère gastrique (modèle de barrière mucilagineuse)

Cette étude in vitro vise à évaluer le potentiel antiulcéreux gastrique de l'extrait végétal en utilisant un modèle de barrière muqueuse basé sur le mucilage végétal, simulant la protection naturelle de la muqueuse gastrique. Le principe repose sur la capacité du mucilage à former une couche protectrice contre les agents agressifs tels que l'éthanol ou l'HCl, responsables de la dégradation de la barrière gastrique. L'activité protectrice est estimée par la mesure de la stabilité ou de la diminution de la dégradation du mucilage, traduite par des variations d'absorbance. Une augmentation de la protection indique un effet gastro protecteur significatif. Les mesures ont été réalisées par spectrophotométrie UV-Visible, permettant de quantifier l'intégrité du système mucilagineux en condition de stress chimique.

Tableau 43: Résultats de l'activité biologique (en pourcentage) et la Absorbon de l'extrait d'*Echinops spinosissimus* comparée à

Concentr ation Extrait	protection % Extrait	Absorba nce Extrait (595nm)	Concentr ation Alignate	protection %Alignate	Absorba nce Alignate (595nm)	Concent ration Antag	protection % Antag	Absorba nce Antag (595nm)	Concen tratiOn lanzopr azole	protection %lanzoprazol e	Absorbance lanzoprazol e(595nm)
0,2	87,72782	0.823	25	78,13853	0.462	40	78,95833	0.48	70	90,81401	1.0995
0,6	90,73395	1.09	70	80	0.505	50	79,13221	0.484	100	92,62774	1.37
0,8	91,61826	1.205	175	84,94784	0.671	80	79,92048	0.503	125	93,91566	1.66
1	93,25767	1.498	200	85,34107	0.689	100	80,65134	0.522	175	94,56551	1.921
1,5	95,35205	2.173	225	86,60477	0.754						
2	97,8692		250	87,60736	0.815						
			275	89,69388	0.98						

différents standards (Lanzoprazole, Alginat, Antag) en fonction des concentrations

Chapitre II: Résultats et discussion

9.1.2 Détermination de l'IC₅₀:

Tableau 30 : Résultats de l'activité biologique (en pourcentage) de l'extrait d'*Echinops spinosissimus* comparée à différents standards (Lanzoprazole, Alginat, Antag) en fonction des concentrations

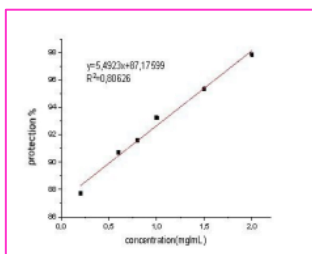


Figure 58:
Courbe de protection de l'activité anti-ulcère gastrique de l'extrait

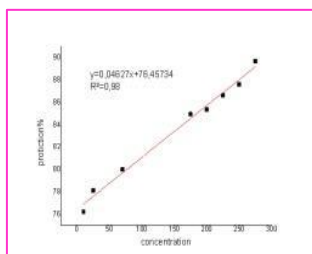


Figure 59 :
Courbe de protection de l'activité anti-ulcère gastrique de l'alginate de Na

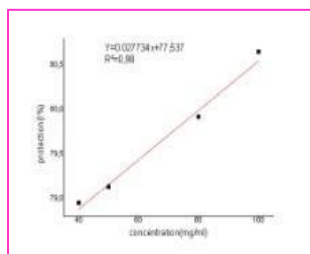


Figure 60:
Courbe de protection de l'activité anti-ulcère gastrique de l'antag

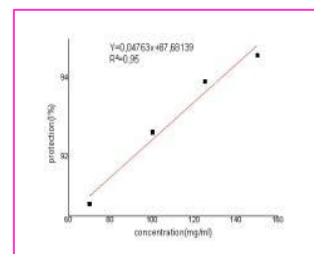


Figure 61:
Courbe de protection de l'activité anti-ulcère gastrique de l'antag

Tableau 44: Modélisation mathématique (équation exponentielle) et valeurs de la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de l'activité anti-ulcéreuse gastrique de l'extrait d'*Echinops spinosissimus* et des substances de référence (Lansoprazole, Antag, Alginate de

Composants	Équation exponentielle	R ²	IC ₅₀ (ug/ml)
Extrait	Y = 5,4923X + 87,17599	0,98	0,006
Alginat de Na	Y = 0,04627x + 76,45734	0,9883	0,615
Antag	Y = 0,027734x + 77,537	0,98	0,992
lansoprazole	Y = 0,04763x + 87,68139	0,95	0,791

➤ La comparaison de l'extrait étudié avec les témoins positifs (Alginate de Na, Antag et Lansoprazole) a révélé que l'extrait présente une activité anti-ulcéreuse hautement significative, avec une valeur d'IC₅₀ de 0,006 µg/mL. D'après les résultats obtenus, l'extrait manifeste une efficacité biologique nettement supérieure à celle de l'ensemble des substances de référence, notamment le Lansoprazole et l'Antag, qui ont enregistré des valeurs respectives de 0,791 µg/mL et 0,992 µg/mL. Par conséquent, l'extrait végétal s'affirme comme le composé le plus puissant de cette série expérimentale, ayant la concentration inhibitrice la plus faible."

Comparaison entre pourcentage de protection de l'extrait et différents standards utilisés :

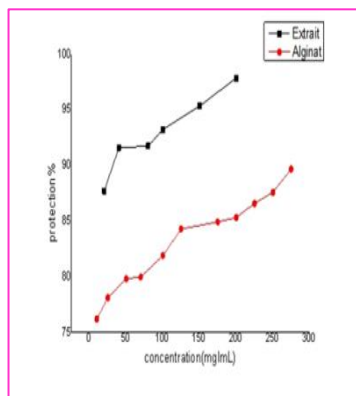


Figure 62: présentation graphique du pourcentage de protection en fonction de différent concentration de l'extrait et alginate de Na

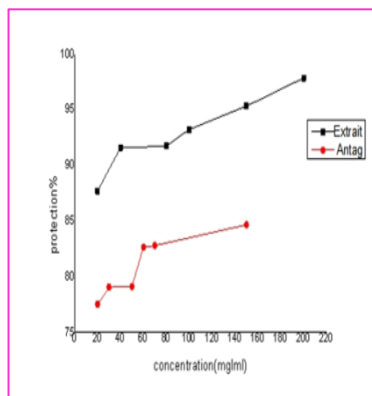


Figure 63: présentation graphique du pourcentage de protection en fonction de différent concentration de l'extrait, antag

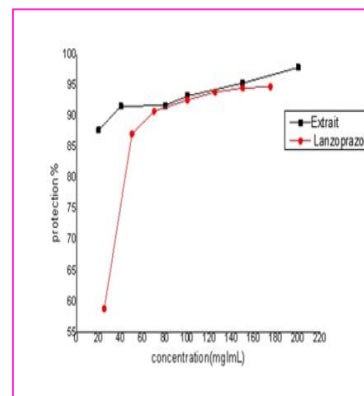


Figure 63: présentation graphique du pourcentage de protection en fonction de différent concentration de l'extrait, lanzoprazole

COMMENTAIRE :

1 entre extrait et Alginat de Na :

L'analyse des résultats montre que l'extrait présente une efficacité inhibitrice supérieure à celle de l'Alginat. À une concentration de 20\text{ mg/mL}, l'extrait atteint un taux d'inhibition de 87,72\%, tandis que l'Alginat affiche une activité plus modérée sur l'ensemble de la gamme de concentrations testées.

2 entre extrait et Antag :

Les données mettent en évidence une supériorité marquée de l'extrait par rapport à l'Antag. L'activité maximale de l'extrait s'élève à 97,86\% pour une concentration de 200\text{ mg/mL}, alors que celle de l'Antag plafonne à 84,69\%, ce qui souligne le fort potentiel bioactif de l'extrait naturel.

3 entre extrait et Lanzoprazole :

Bien que le Lanzoprazole soit un agent de référence, l'extrait manifeste une efficacité nettement supérieure aux faibles concentrations (en dessous de 40\text{ mg/mL}). À 20\text{ mg/mL}, l'extrait inhibe à 87,72\% contre seulement 58,85\% pour le Lanzoprazole à 25\text{ mg/mL}, démontrant ainsi une action plus rapide et plus puissante.

Tableau 45: Comparaison de l'activité anti-ulcère gastrique des différents traitements (Extrait, Antag, Lanzoprazole, Alginat de sodium) en présence d'éthanol-HCl

Chapitre II: Résultats et discussion

Composants	Concentration(mg/ml)
controlEthanol-HCL	0
Extrait 20mg/ml	87,72
extrait 100mg/ml	93,25
Antag50mg/ml	79,13
lanzoprazol50mg/m	87,11
Alginat de Na50mg/ml	79,84

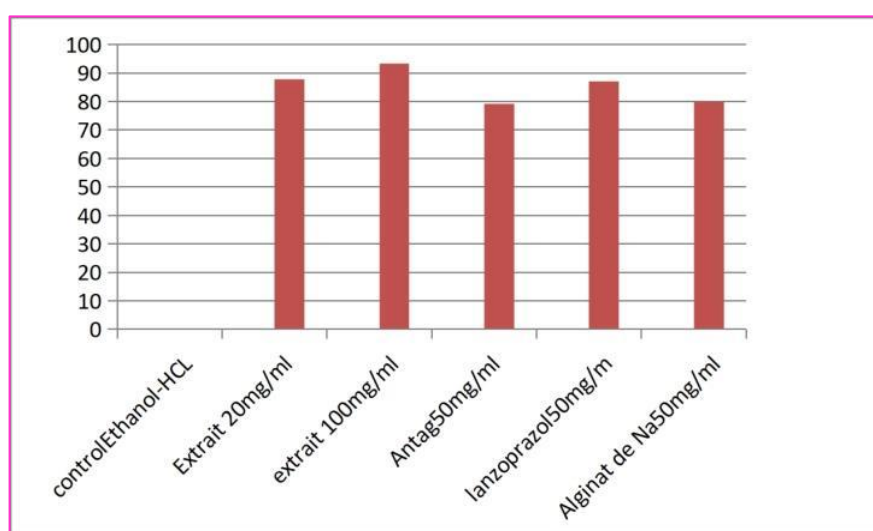


Figure 64: Étude comparative de l'activité anti-ulcéreuse de l'extrait végétal et des médicaments de référence (Lanzoprazole, Alginate de Na et Antag) contre les lésions induites par l'éthanol/HCL.

L'analyse de l'histogramme révèle que l'extrait végétal exerce un effet anti-ulcéreux dose-dépendant, avec un taux d'inhibition maximal de 93% à la concentration de 100 mg/ml. À cette dose, l'efficacité de l'extrait est supérieure à celle du Lanzoprazole (87%), de l'Alginate de Na (80%) et de l'Antag (79%). Ces résultats mettent en évidence le fort potentiel protecteur de l'extrait par rapport aux traitements de référence testés.

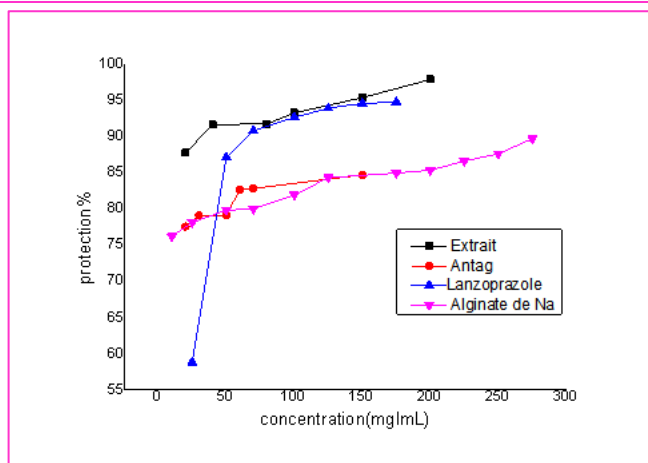


Figure 65: présentation graphique/courbe présente du pourcentage de protection de muqueuse gastrique en fonction de différent concentration de l'extrait, lanzoprazole lantag aligenat

Cette courbe illustre l'évolution de l'activité gastroprotectrice de la muqueuse gastrique en fonction de différentes concentrations de l'extrait végétal, en comparaison avec des médicaments de référence (lanzoprazole, alginate et antag). Les résultats indiquent une augmentation progressive du pourcentage de protection avec l'élévation de la concentration pour l'ensemble des échantillons étudiés. L'extrait a montré une activité significative, avec des valeurs proches de celles des standards, en particulier le lanzoprazole, ce qui suggère une efficacité notable. L'alginate présente une activité relativement plus modérée, mais demeure dépendante de la dose. Ces observations mettent en évidence le potentiel gastroprotecteur de l'extrait, pouvant être comparable, dans certaines conditions expérimentales, à celui des médicaments de référence.

9.1.3. Évaluation de l'activité anti-glycation (BSA-glucose):

Cette étude *in vitro* vise à évaluer le potentiel anti-glycation de l'extrait végétal en utilisant le modèle BSA-glucose, qui simule la formation des produits de glycation avancée (AGEs) impliqués dans de nombreuses pathologies chroniques. Le principe repose sur la réaction non enzymatique entre l'albumine sérique bovine (BSA) et le glucose, conduisant à la formation de composés fluorescents caractéristiques de ces produits. L'activité inhibitrice de l'extrait est estimée par sa capacité à réduire la formation de ces composés, se traduisant par une diminution de l'intensité de fluorescence. Une réduction significative de la fluorescence indique une activité anti-glycation importante. Les mesures ont été réalisées par spectrofluorimétrie, permettant de quantifier le degré d'inhibition du processus de glycation en fonction utilisant le concentrations testées.

9.1.4 Détermination de l'IC₅₀ extrait:

Tableau 46: Résultats du inhibition protection de l'extrait à différents concentration

Concentration extrait(mg/ml)	Inihbition extrait%
0,2	87,72782
0,6	90,73395
0,8	91,61826
1	93,25767
1,2	95,35205
2	97,8692

9.1.5Détermination de l'IC₅₀ metformine:**Tableau 47: Le taux d'inhibition des radicaux libres par la metformine en fonction de la concentration.**

Concentration (mg/ml)	Absorbance (580nm)	Inhibition (%)
10	0.156	79.2
20	0.135	82
30	0.134	83.66
40	0.12	84.23
50	0.105	86
60	0.103	87.3215
70	0.099	88.36
80	0.098	89.45
100	0.089	90.58

9.1.6Détermination de l'IC quercetine:**Tableau 48: Le taux d'inhibition des radicaux libres par la quercetine en fonction de la concentration.**

Concentration (mg/ml)	Absorbance (580nm)	Inhibition (%)
10	0.156	79.2
20	0.135	82
30	0.134	83.66
40	0.12	84.23
50	0.105	86

Chapitre II: Résultats et discussion

60	0.103	87.3215
70	0.099	88.36
80	0.098	89.45
100	0.089	90.58

Tableau 49: Modélisation mathématique (équation exponentielle) et valeurs de la concentration inhibitrice médiane (IC50) de l'activité anti-ulcéreuse gastrique de l'extrait d'*Echinops spinosissimus* L. et des substances de référence (metformine et quercétine).

Composants	Équation exponentielle	R ²	IC50 (ug/ml)
Extrait	$Y = 5,4923X + 87,17599$	0,95	0,067
Metformine	$Y = 95,275 - 18,072 \cdot \exp(-0,00136 \cdot X)$	0,983	0,072
Quercetine	$Y = 89,43 - 42,56 \cdot \exp(-0,009 \cdot X)$	0,9843	0,008

La comparaison avec les témoins positifs metformine et quercétine a révélé que l'extrait étudié présentait une activité inhibitrice significative, avec une valeur de IC50 de 0,067 mg/mL. D'après les résultats obtenus, l'extrait manifeste une efficacité biologique supérieure à celle de la metformine, laquelle a enregistré une valeur de 0,072 mg/mL. En revanche, la quercétine demeure le composé le plus puissant avec la concentration inhibitrice la plus faible, soit 0,008 mg/mL.

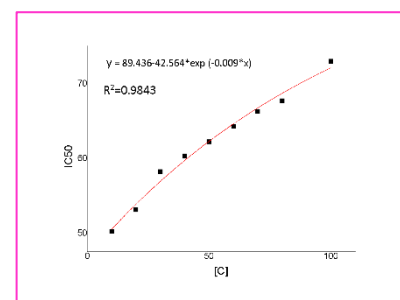
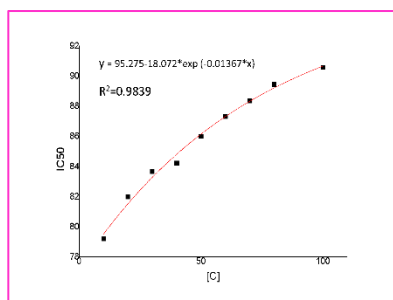
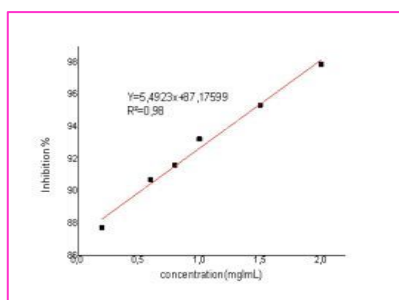


Figure 66 : Courbe du taux inhibition de l'activité anti-glycation de l'extrait

Figure 67: Courbe du taux inhibition de l'activité anti-glycation du metformine

Figure 68: Courbe du taux inhibition de l'activité anti-glycation de la quercétine

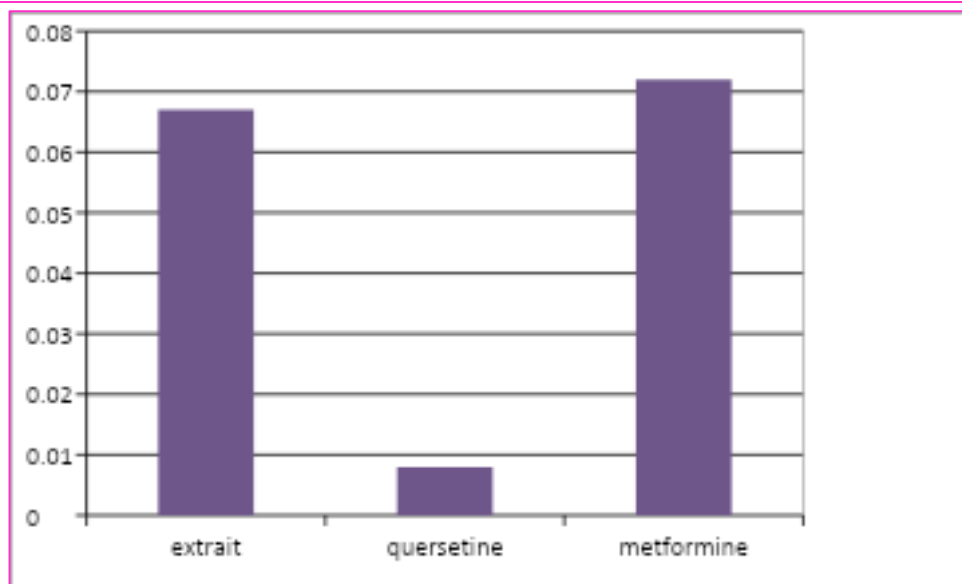


Figure 69: Comparaison des valeurs IC50 (mg/ml) de l'extrait végétal et des molécules de référence (Metformine et Quercétine).

L'évaluation de l'activité inhibitrice montre que l'extrait présente une efficacité remarquable avec une IC50 de 0,067 mg/mL, surpassant ainsi la metformine (0,072 mg/mL). Toutefois, la quercétine affiche l'activité la plus puissante avec une valeur minimale de 0,008 mg/mL. La fiabilité de ces données est confirmée par des coefficients de détermination (R2) élevés, compris entre 0,95 et 0,984, attestant d'une excellente corrélation statistique.

Évaluation de l'interaction entre le BSA et l'extrait

L'étude de l'interaction entre l'extrait et la protéine BSA est une étape cruciale pour comprendre comment les composés végétaux se lient aux protéines de transport. Cette étude a été réalisée en suivant les changements du spectre d'absorption de l'extrait lors de l'ajout de concentrations croissantes de la protéine.

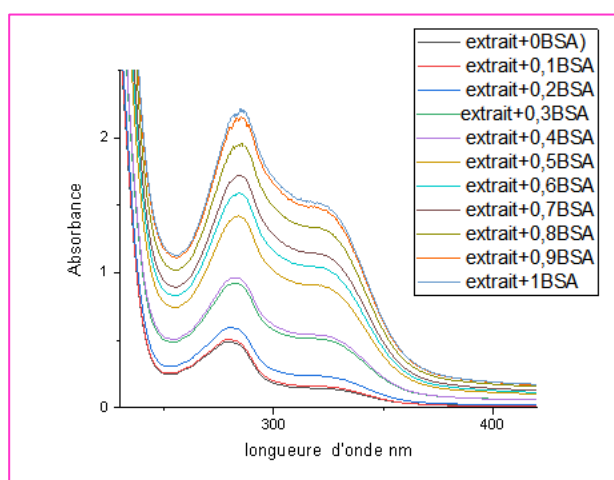


Figure 70: Courbe de l'extrait étudiée en faisant réagir différentes concentrations de BSA.

Chapitre II: Résultats et discussion

Commentaire : Ces courbes représentent les spectres d'absorption de l'extrait phénolique lors de son interaction avec différentes concentrations de BSA. Les résultats montrent une variation progressive de l'intensité d'absorbance, confirmant ainsi la formation de complexes entre l'extrait et la protéine.

10.Détermination IC50:

Tableau 50: Résultats du pourcentage d'interaction de l'extrait d'*Echinops spinosissimus* avec la BSA en fonction des différentes concentrations.

c	A-A0/A*100	Absorbance(255nm)
0,1	11,74339	0.48727
0,2	17,7212	0.5518
0,3	46,79224	0.59189
0,4	49,41994	0.91528
0,5	65,689	0.96283
0,6	69,19807	1.41937
0,7	71,74748	1.58107
0,8	75,05123	1.72374
0,9	77,26668	1.952
1	78,04645	2.14223

11.Détermination de Ic50:

Tableau 51: Modélisation mathématique (équation exponentielle) et valeurs de la concentration inhibitrice médiane (IC50) de l'activité anti-ulcéreuse gastrique de l'extrait d'*Echinops spinosissimus* .

Composants	Équation	R ²	IC50 (ug/ml)
Extract	$Y = 85,31536 - 104,2041 * \exp(-2,92247 X)$	0,95	0.3702

Tableau 52: Équation exponentielle des résultats.

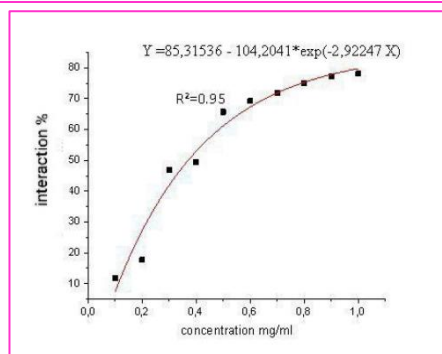


Figure 09 : Courbe du taux d'interaction avec la BSA de l'extrait.

Tableau 10 : Valeur de la concentration inhibitrice moyenne (IC50) de l'extrait dans le test d'interaction avec la BSA.

12. Détermination de la constante de liaison (K) et de l'énergie libre de Gibbs (ΔG)

Tableau 53: Résultats de l'inverse de la concentration (1/c) et de la réponse spectrophotométrique ($A/A_0 - A$).

1/c	$A/A_0 - A$	absorbance(255nm)
5	-5,64296	0.48727
3,33333	-2,13711	0.5518
2,5	-2,02347	0.59189
2	-1,52232	0.91528
1,66667	-1,44513	0.96283
1,42857	-1,39378	1.41937
1,25	-1,33242	1.58107
1,11111	-1,29422	1.72374
1	-1,28129	1.952

Tableau 54: Équation de la régression linéaire pour la détermination des paramètres de liaison

Composants	Équation	R2
Extrait	$Y = -0,82498x - 0,18994$	0,99

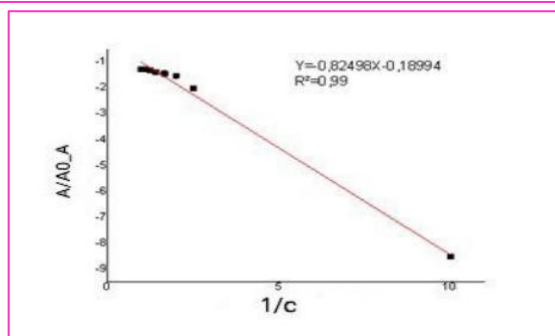


Figure 71: Droite de $A_0 / (A - A_0)$ en fonction de $1 / [l'extract]$.

Tableau 55: Valeurs du coefficient de liaison (K) et de l'énergie libre de Gibbs (ΔG).

Composants	K (M-1)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
Extrait	1.442	-18,03

Commentaire : Les résultats montrent que la constante de liaison (K) est de 1,442 M⁻¹. La valeur négative de l'énergie libre de Gibbs ($\Delta G = -18,03$ KJ.mol⁻¹) indique que le processus de liaison entre l'extrait et la BSA est un processus spontané et thermodynamiquement stable.

II. In silico

1.1 Analyse des résultats obtenus avec SwissADME :

1.1.1 Propriétés physico-chimiques

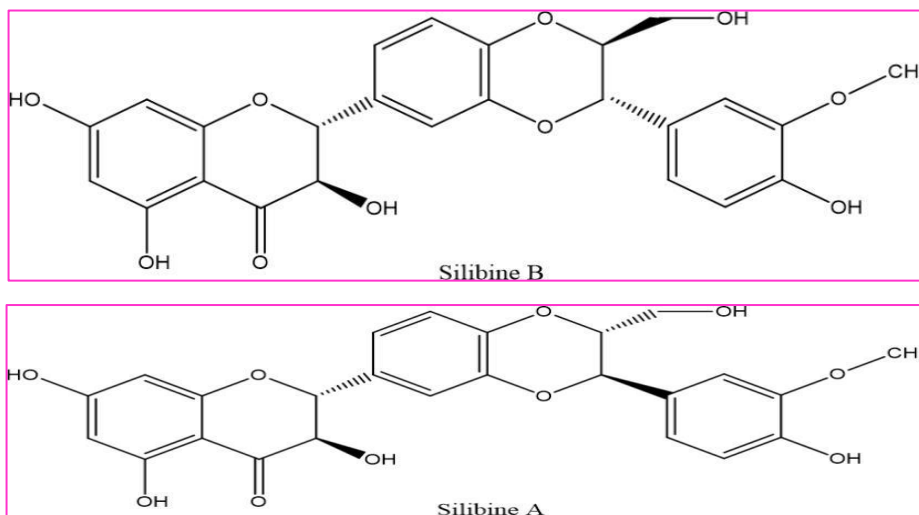


Figure 72 : Structure des diastéréoisomères de la silibine

Chapitre II: Résultats et discussion

Composant s	Formule	MW (g/ mol)	NHA	Csp 3	NRB	HBA	HBD	Log P	Log S	MR
Silibine A	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	482,44	35	0,24	4	10	1,51	1,51	-4.78	120,5 5
Silibine B	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	482,44	35	0,24	4	10	1,59	1,59	-4.78	120,5 5
Diclofénac	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296,15	19	0,07	4	2	3,66	3,66	-5.15	77,55
Prednisolon e	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360,44	26	0,71	2	5	1,74	1,74	-3.22	97,06

Tableau 56: Propriétés physicochimiques des extraits végétaux et du diclofénac (SwissADME).

Concernant l'extrait :

- ✧ Selon le tableau, l'extrait de plante analysé présente un poids moléculaire avec une variabilité acceptable ($150 < PM < 600$ g/mol).
- ✧ Ce composé possède un nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène (HBA) égal à 10 et un nombre de donneurs de liaisons hydrogène (HBD) égal à 5.
- ✧ Les valeurs de lipophilicité (LogP) pour ce composé sont toutes inférieures à 5.
- ✧ La surface polaire topologique (TPSA) de ce composé est inférieure à $160 \text{ \AA}^2$.
- ✧ On note également que le nombre de liaisons rotatives est inférieur à 6. **Concernant le médicament témoin :**

- ✧ Selon le tableau, le médicament analysé présente un poids moléculaire avec une variabilité acceptable ($150 < PM < 450$ g/mol).
- ✧ Ce composé possède un nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène (HBA) inférieur à 5, sauf pour la prednisolone qui est égal à 5, et un nombre de donneurs de liaisons hydrogène (HBD) inférieur à 5.

Les valeurs de LogP montrent que le médicament est inférieur à 5.

- ✧ Concernant la TPSA, le médicament étudié présente des valeurs inférieures à $100 \text{ \AA}^2$.
- ✧ Le nombre de liaisons rotatives est également inférieur à 6.

1.1.2 Propriétés de « drug-likeness » :

Tableau 57: Détails des différentes règles de « drug-likeness » et de biodisponibilité pour l'extrait de plante (SwissADME)

Chapitre II: Résultats et discussion

Violation de Lipinski	Violation de Ghose	Veber	Egan	Muegge	Biodisponibilité Score	Alertes PA
Ouis; 0	Non;1 MW>480	Non;1 TPSA>14 0	Non; 1 TPSA>131. 6	Non; 1 TPSA>15 0	0,55	0
Ouis; 0	Non;1 MW>480	Non;1 TPSA>14 0	Non; 1 TPSA>131. 6	Non; 1 TPSA>15 0	0 ;55	0
Ouis; 0	Oui	Oui	Oui	Oui	0 ;85	0
Ouis; 0	Oui	Oui	Oui	Oui	0 ;55	0

Concernant l'extrait :

Le composé respecte bien la règle de Lipinski, suggérant un bon potentiel d'absorption orale. Cependant, il ne satisfait pas aux règles de Ghose, Veber, Egan et Muegge, principalement en raison de sa valeur élevée de TPSA. La biodisponibilité estimée est de 55 %, indiquant une absorption orale potentiellement limitée.

Concernant le médicament de référence :

Les règles de Lipinski, Ghose, Veber, Egan et Muegge ont montré un score de 85 %, indiquant une bonne biodisponibilité pour le diclofénac. Quant à la prednisolone, le score est de 55 %.

1.1.3. Paramètres pharmacocinétiques :

Tableau 58: Résultats des paramètres pharmacocinétiques de l'extrait végétal étudié et du médicament (SwissADME).

Paramètre Extrait	GI absorption	BBB perméabilité	P-gp	CYP 1A2 inhibiteur	CYP 2C19 inhibiteur	CYP 2C9 inhibiteur	CYP 2D6 inhibiteur	CYP 3A4 inhibiteur	Log K _p (cm/s)
Silibine A	faible	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	-7.89
Silibine B	faible	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	-7.89
Diclofénac	élevée	Oui	Non	Oui	OUI	Oui	Oui	Non	-4.98
Prednisolone	élevée	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	-7.35

Concernant l'extrait :

Chapitre II: Résultats et discussion

- ✓ Le coefficient de perméabilité du composé (Kp) s'est avéré négatif.
- ✓ Le paramètre gastro-intestinal (GI) est indiqué comme faible (Low), ce qui signifie que les molécules sont faiblement absorbées au niveau de l'absorption intestinale humaine (HIA).
- ✓ L'analyse de la molécule à l'aide du paramètre de la barrière hémato-encéphalique (BBB), qui protège le système nerveux central (SNC), montre qu'elle est prédite comme non perméable à cette barrière. Cela constitue un résultat défavorable pour des composés destinés à agir au niveau du système nerveux central.
- ✓ Nos tests ont montré que la molécule n'inhibe pas et n'altère pas l'activité des différentes isoformes des enzymes du cytochrome P450, notamment CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 et CYP2C9.

Concernant le médicament de référence :

- ✓ Le coefficient de perméabilité du composé (Kp) s'est avéré négatif.
- ✓ Le paramètre gastro-intestinal (GI) est indiqué comme élevé (High), ce qui signifie que les molécules sont fortement absorbées au niveau de l'absorption intestinale humaine (HIA).
- ✓ L'analyse du médicament à l'aide du paramètre de la barrière hémato-encéphalique (BBB) montre qu'il est prédit comme perméable à cette barrière, ce qui constitue un bon résultat pour les composés destinés à agir sur le système nerveux central dans le cas du diclofénac, mais un résultat défavorable pour la prednisolone.
- ✓ Nos tests ont montré que la molécule n'inhibe pas et n'altère pas l'activité des différentes isoformes des enzymes du cytochrome P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 et CYP2C9).
- ✓ Cependant, la prednisolone n'inhibe ni n'altère l'activité des isoformes des enzymes du cytochrome P450 CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP2C9 et CYP3A4.

1.2. Prédiction de la toxicité par PROTOX :

Tableau 59: Prédiction de la toxicité des plantes et des médicaments (ProTox).

Chapitre II: Résultats et discussion

Compo nents	LD50 (mg/kg)	PTC	Hepatotoxicity	Carcinogenicit y	Immunotoxicity	Mutagenicity	Cytotoxicit y
Silibine A	2000	4	Inactif (P=0.78)	Inactif (P=0.72)	Actif(P=0.97)	Inactif (P=0.69)	Inactif(P=0 .77)
Silibine B	2000	4	Inactif (P=0.78)	Inactif (P=0.72)	Actif (P=0.97)	Inactif (P=0.69)	Inactif (P=0.77)
Diclofé nac	53	3	Actif(P=0.81)	Inactif(P=0.64)	Inactif (P=0.99)	Inactif (P=0.78)	Inactif(P=0 .74)
Prednis olone	1680	4	Inactif(P=0.99)	Inactif (P=0.94)	Actif (P=0.99)	Inactif (P=0.53)	Inactif (P=0.76)

Concernant l'extrait :

Les résultats de la DL50 indiquent que l'extrait végétal étudié est légèrement toxique (nocif en cas d'ingestion).

Concernant le médicament de référence :

Diclofénac : Les résultats de la DL50 indiquent que le médicament étudié est modérément toxique.

Prednisolone : Elle est légèrement toxique.

1.3. Analyse des résultats obtenus par le docking moléculaire :

Activité anti-inflammatoire in silico

Tableau 60: Différentes valeurs de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) de l'interaction de l'extrait végétal avec la cyclooxygénase-2 obtenues par docking.

Components	K (mol ⁻¹)	ΔG (kj.mol ⁻¹)
Silibine A	9.97×10^{-01}	-23.11
Silibine B	9.97×10^{-01}	-25.20
Diclofénac	2.538×10^3	-19.437
Prednisolone	1.4909×10^4	-23.826

Chapitre II: Résultats et discussion

✓ Selon les valeurs de l'énergie libre de liaison ΔG , il est à noter que la silibine B est plus stable que la silibine A, avec une valeur de ΔG plus négative ($-25,20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).

✓ Pour le médicament standard, la prednisolone présente une valeur de ΔG plus négative ($-23,826 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).

✓ Les valeurs de ΔG obtenues pour la silybine, en particulier la silybine B, sont plus négatives que celles du médicament standard utilisé, ce qui indique de bonnes interactions avec l'enzyme cyclooxygénase-2.

1.4. Détermination du site d'interaction de la molécule étudiée : Afin de déterminer le site et le type de liaison formée entre l'extrait végétal et la cyclooxygénase-2, nous avons utilisé la base de données PLIP (Protein-Ligand Interaction Profile).

Les résultats obtenus concernant l'interaction entre l'extrait végétal et la cyclooxygénase-2 sont présentés dans le tableau et la figure suivants.

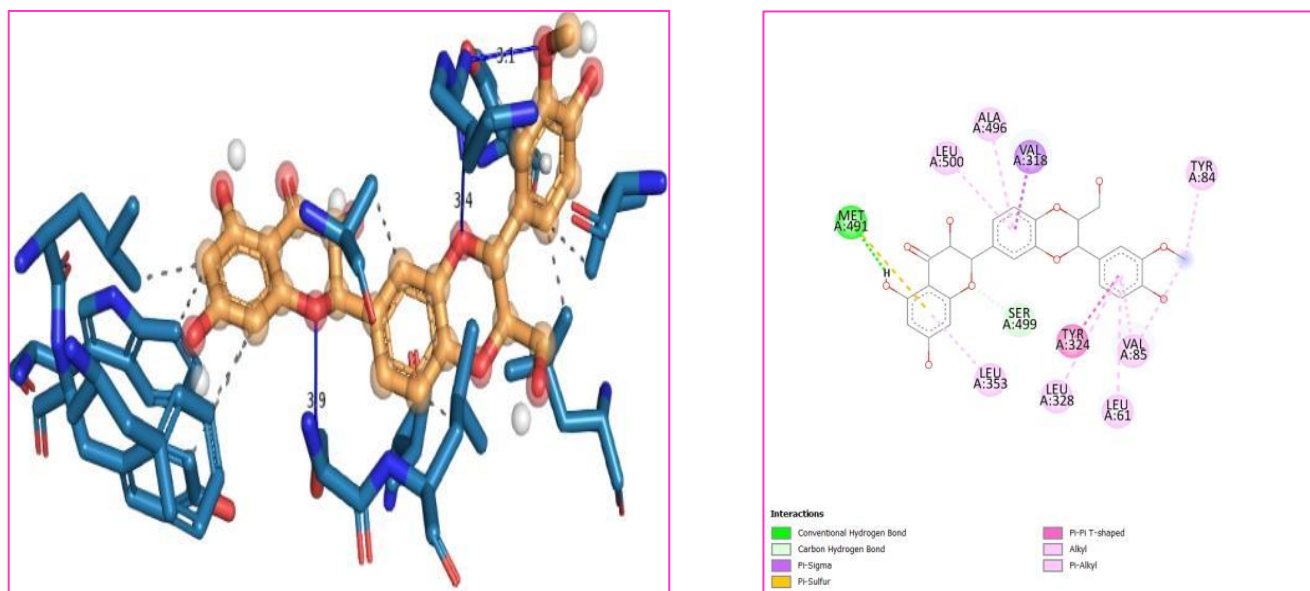


Figure 73: Mode d'interaction entre le site actif de la silybine A et la cyclooxygénase-2, en représentations 2D et 3D.

SilybinA_cyclooxygénase-2-					
Hydrophobic Interaction					
Index	Résidu	AA	Distance	Atom du ligand	Atom de la protéine
1	85A	VAL	3.09	33	877
2	318A	VAL	2.88	10	3181
3	328A	LEU	3.00	33	3290

Chapitre II: Résultats et discussion

4	350A	PHE	3.81	15	3527				
5	353A	LEU	3.28	20	3557				
6	354A	TYR	3.88	15	3569				
7	356A	TRP	3.64	20	3598				
8	496A	ALA	3.86	8	4967				
9	500A	LEU	3.44	10	5003				
Liaisons hydrogène									
Index	Résidu	AA	Distance H.A	Distance D.A	Donor Angle	Donneur protéique ?	Chaîne latérale	Atome donneur	Atom Acceptur
1	89A	ARG	2.74	3.11	101.59	✓	✓	915[NG+]	34[O3]
2	89A	ARG	2.44	2.36	149.59	✓	✓	914[NG+]	1[O3]
3	499A	SER	3.38	2.94	120.01	✓	✓	4993[O3]	12[O3]

Tableau 61 : Liaisons au site d'interaction de la silybine A avec la cyclooxygénase-2 (PLIP).

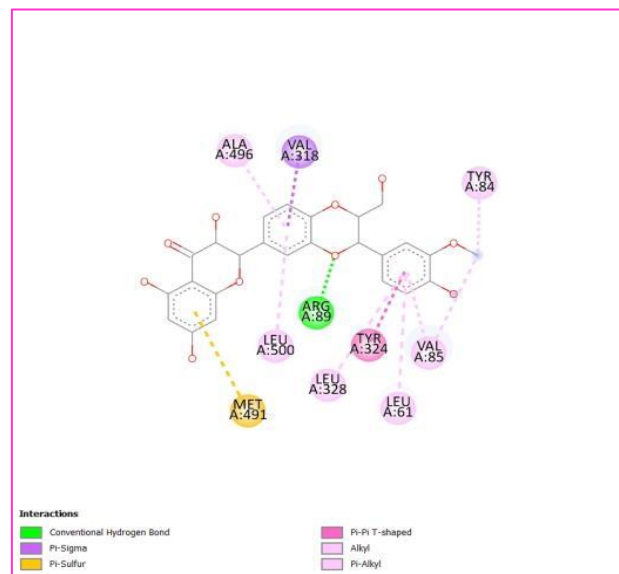
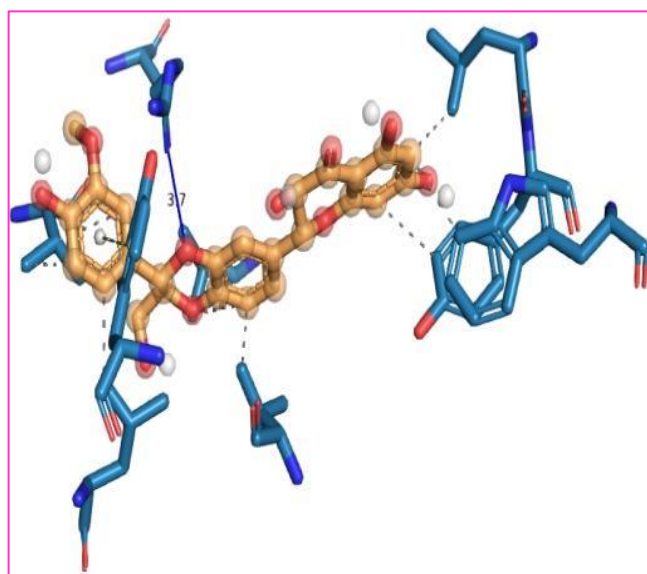


Figure 74: the interaction mode between the active site of silybin B and Cyclooxygenase-2, in both 2D and 3D representations

Tableau 62: Liaisons au site d'interaction de la silybine B avec la cyclooxygénase-2 (PLIP).

SilybinB- cyclooxygenase-2-									
Hydrophobic Interaction									
Index		Résidu	AA	Distance	Atom du ligand		Atom de la protéine		
1		85A	VAL	3.17	32		876		
2		85A	VAL	3.35	33		877		
3		85A	VAL	3.65	29		875		
4		318A	VAL	2.85	10		3181		
5		328A	LEU	2.82	33		3290		
6		353A	LEU	3.69	20		3557		
7		354A	TYR	3.80	15		3569		
8		356A	TRP	3.18	20		3598		
9		500A	LEU	3.85	10		5003		
Hydrogen bonds									
Index	Résidu	AA	Distance H -A	Distance D -A	Angle du donneur	donner Protein?	Chaîne latérale	Atom donneur	Atome Accepteur
1	89A	ARG	2.74	3.66	149.29	✓	✓	914[O3]	1[O3]

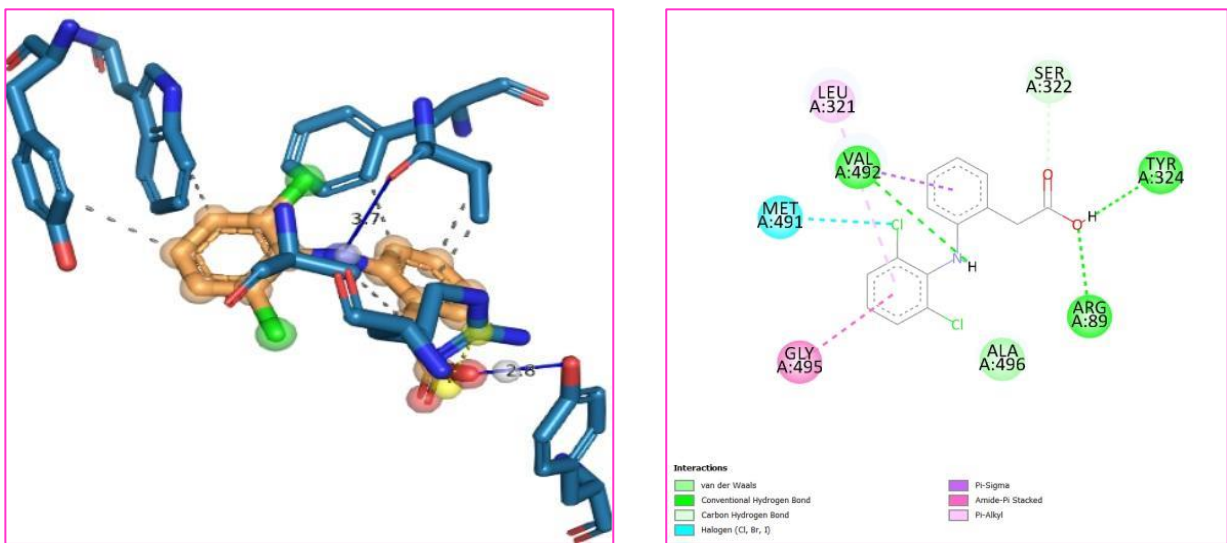


Figure 75Mode d'interaction entre le site actif de la silybine A et le diclofénac, en représentations 2D et 3D.

Tableau 63: Liaisons au site d'interaction du diclofénac avec la cyclooxygénase-2 (PLIP).

Diclofenac- cyclooxygenase-2-									
Hydrophobic Interaction									
Index	Résidu		AA	Distance	Atom du ligand		Atomes de la protéine		
1	354A		TYR	3.46	13		3550		
2	356A		TRP	3.54	14		3579		
3	487A		PHE	3.68	4		4874		
4	492A		VAL	3.54	6		4918		
5	492A		VAL	3.24	1		4917		
6	496A		ALA	3.63	17		4948		
Hydrogen Bonds									
Index	Résidu	AA	Distance H-A	Distance D -A	Angle du donneur	Donneur protéique	Chaîne latérale	Atome donneur	Atom accepteur
1	324A	TYR	1.82	2.80	173.20	✗	✓	20 [O.co2]	3223[O3]
2	492A	VAL	3.03	3.73	127.42	✗	✗	7[Npl]	4915 [O2]

1.5. Comparaison des résultats in silico et in vitro de K et ΔG :

Tableau 64: Comparaison des résultats in silico et in vitro de K et ΔG.

Composants	In vitro		In silico	
	K(mol-1)	ΔG(Kj.mol-1)	K(mol-1)	ΔG(Kj.mol-1)
Silybin A	462.22	-14.75	11234.5	-23.11
Silybin B			26168.5	-25.20
Diclofénac	1.790×10^3	-18.571	2.538×10^3	-19.437
Prednisolone	1.2853×10^4	-23.458	1.4909×10^4	-23.826

Chapitre II: Résultats et discussion

La comparaison montre que les résultats de K et ΔG obtenus in silico pour l'extrait et le médicament standard (interaction des extraits et du médicament avec la cyclooxygénase) sont proches de ceux obtenus in vitro (interaction de l'extrait et du médicament avec la BSA).

2. Activité anti-antidiabétiques

2.1. Prédiction de la toxicité par PROTOX :

"Le protocole d'étude in silico relatif à l'activité anti-diabétique est rigoureusement identique à l'approche méthodologique adoptée pour l'activité anti-inflammatoire

Tableau 65: Prédiction de la toxicité des plantes et des médicaments (ProTox).

Components	LD50 (mg/kg)	PTC	Hepatotoxicity	Carcinogenicity	Immunotoxicity	Mutagenicity	Cytotoxicity
Silibine A	2000	4	Inactif (P=0.78)	Inactif (P=0.72)	Actif(P=0.97)	Inactif (P=0.69)	Inactif(P=0.77)
Silibine B	2000	4	Inactif (P=0.78)	Inactif (P=0.72)	Actif (P=0.97)	Inactif (P=0.69)	Inactif (P=0.77)
Acarbose	24000	0.193	Active(P=0.65)	Inactive (P=0.84)		Inactive (P=0.76)	Inactive (P=0.70)

Concernant l'extrait :

Les résultats de la DL50 (2000 mg/kg) indiquent que l'extrait végétal étudié est légèrement

toxique (nocif en cas d'ingestion).

Concernant le médicament de référence :

Acarbose : Les résultats de la DL50 (24000 mg/kg) indiquent que le médicament étudié est non toxique

2.1.1. Détermination du site d'interaction de la molécule étudiée :

Afin de déterminer le site ainsi que le type de liaison formée entre l'extrait végétal et l'enzyme α -amylase, nous avons eu recours à la base de données PLIP (Protein-Ligand Interaction Profile).

Les résultats obtenus relatifs à l'interaction entre l'extrait végétal et l'enzyme α -amylase sont présentés dans le tableau et la figure ci-après.

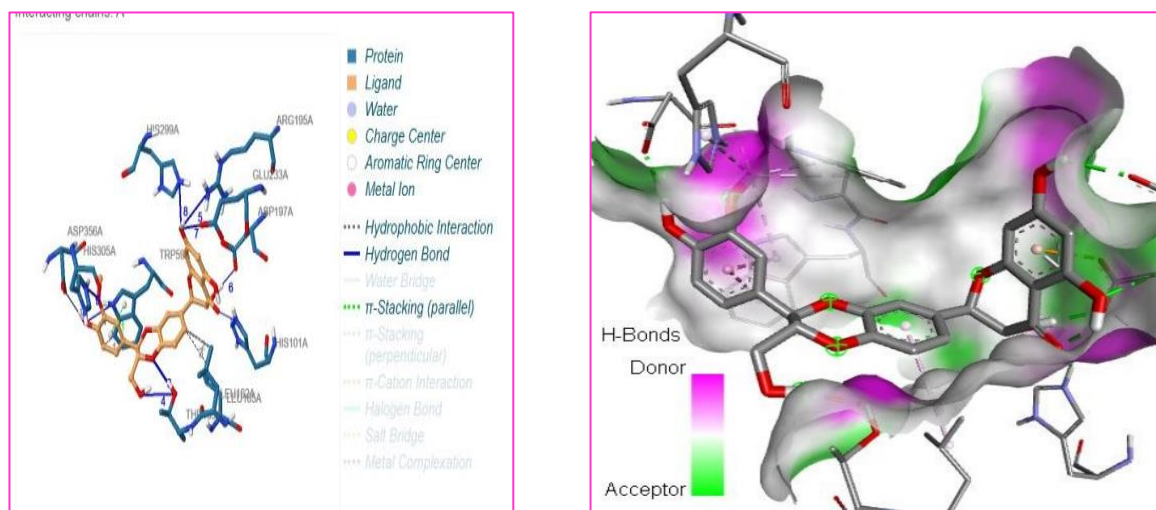


Figure 76: Mode d'interaction entre le site actif de la silibine A et l'alpha-amylase, en représentations 2D et 3D.

Tableau 66 : Liaisons au site d'interaction de la silybine A avec l'alpha-amylase

SilybinA- l'alpha-amylase									
Hydrophobic Interactions									
Index	Résidu		AA		Distance		Atom du ligand		Atom de la protéine
1	59A		TRP		3.41		7		626
2	162A		LEU		3.82		24		1622
3	165A		LEU		3.44		24		1644
Hydrogen Bonds									
Index	Résidu	AA	Distance H.A	Distance D.A	Donor Angle	Donneur protéique ?	Chaîne latérale	Atome donneur	Atom Acceptur
1	59A	TRP	2.76	3.55	134.49	✓	✓	625[Nar]	20[O3]
2	101A	HIS	2.35	3.10	129.37	✓	✓	1062[NPI]	8[O2]
3	163A	THR	2.25	3.19	171.68	✓	✓	1630[O3]	4[O3]
4	163A	THR	2.65	3.52	146.54	✗	✓	18[O3]	1630[O3]
5	195A	ARG	2.82	3.53	126.77	✓	✓	1935[NG+]	12[O3]
6	197A	ASP	1.89	2.85	162.67	✗	✓	16[O3]	1958[O.CO2]
7	233A	GLU	2.08	2.82	127.92	✗	✓	12[O3]	2315[O-]
8	299A	HIS	3.69	4.06	104.21	✓	✓	2959[NPI]	12[O3]

Chapitre II: Résultats et discussion

9	305A	HIS	2.32	3.05	127.55	✓	✓	3026[NPI]	2[O3]
10	356A	ASP	2.03	3.00	160.03	✗	✓	20[O3]	3530[O.CO2]

Tableau 67: Liaisons au site d'interaction de la silybine B avec l'alpha-amylase

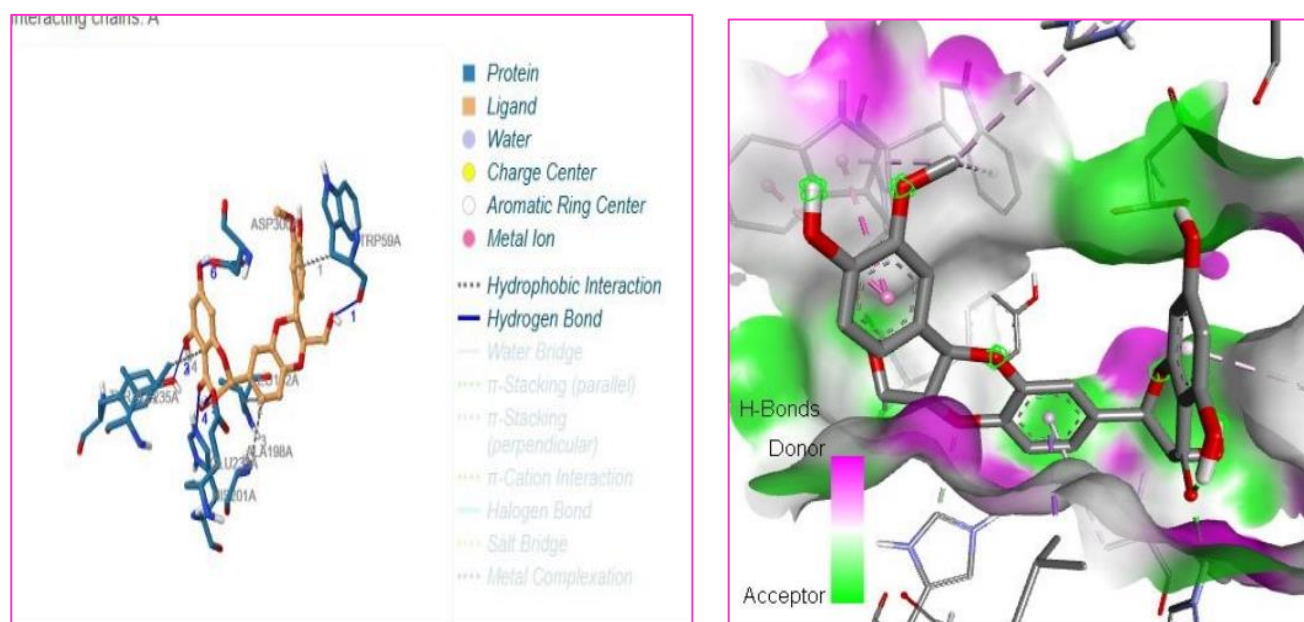


Figure 77: Représentation en 2D et en 3D du mode d'interaction entre SilybinB et l'alpha-amylase au niveau du site actif

SilybinB- l'alpha-amylase									
Hydrophobic Interactions									
Index	Résidu	AA	Distance	Atom du ligand	Atom de la protéine				
1	59A	TRP	3.39	13	619				
2	162A	LEU	3.90	24	1622				
3	198A	ALA	3.52	24	1964				
4	235A	ILE	3.63	29	2332				
Hydrogen Bonds									
Index	Résidu	AA	Distance H.A	Distance D.A	Donor Angle	Donneur protéique ?	Chaîne latérale	Atome donneur	Atom Accepteur
1	59A	TRP	1.94	2.57	119.15	✗	✗	18[O3]	618[O2]
2	151A	TYR	3.67	4.02	104.95	✓	✓	1507[O3]	14[O3]
3	151A	TYR	3.35	4.02	125.09	✗	✓	14[O3]	1507[O3]
4	201A	HIS	1.71	2.64	149.49	✓	✓	1996[NPI]	8[O2]

Chapitre II: Résultats et discussion

5	233A	GLU	2.04	3.01	163.68	✗	✓	16[O3]	2315[O-]
6	300A	ASP	1.83	2.71	142.74	✗	✓	12[O3]	2969[O3]

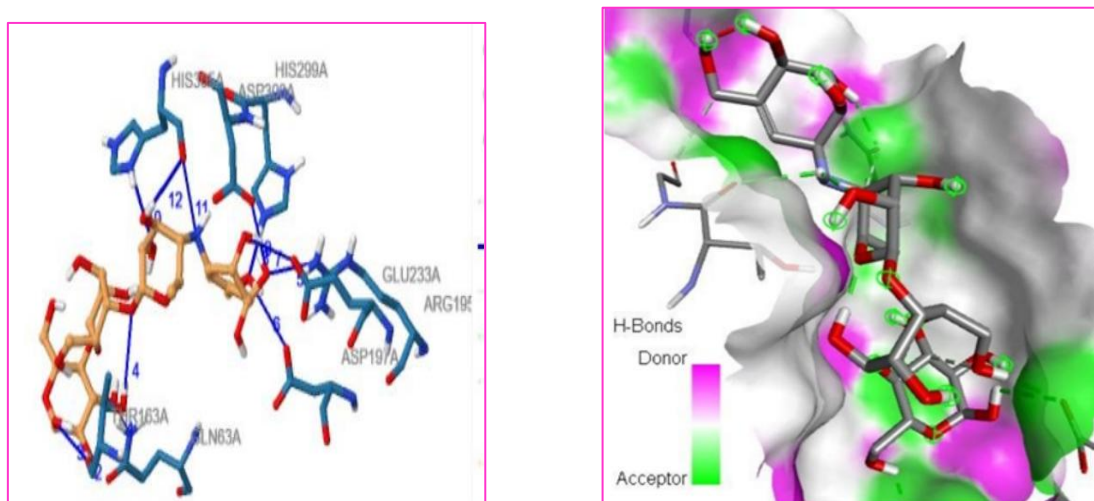


Figure 78: Représentation en 2D et en 3D du mode d'interaction entre l'acarbose et l'alpha-amylase au niveau du site actif

Tableau 68: Liaisons au site d'interaction de l'acarbose avec l'alpha-amylase

l'acarbose et l'alpha amylase									
Hydrogen Bonds									
Index	Résidu	AA	Distance H-A	Distance D -A	Angle du donneu r	Donneu r protéiq ue	Chaîne latérale	Atome donneur	Atom accepteur
1	63A	GLN	1.93	2.79	140.60	✓	✓	697[Nam]	57[O3]
2	163A	THR	2.11	3.03	159.09	✗	58X68 5	55[O3]	1645[O2]
3	163A	THR	2.21	3.05	144.22	✗	✗	53[O3]	1645[O2]
4	163A	THR	2.81	3.72	160.63	✓	✓	1648[O3]	7[O3]
5	195A	ARG	2.04	3.00	155.17	✓	✓	1953[Ng+]	30[O3]
6	197A	ASP	2.86	3.78	159.45	✗	✓	28[O3]	1975[O3]
7	233A	GLU	2.18	2.98	138.80	✗	✓	34[O3]	2333[O.co2]

Chapitre II: Résultats et discussion

8	299A	HIS	1.72	2.74	173.75	✓	✓	2977[NpI]	28[O3]
9	300A	ASP	2.07	2.88	139.94	✗	✓	30[O3]	2988[O-]
10	305A	HIS	2.66	3.36	125.59	✓	✓	3042[NpI]	15[O3]
11	305A	HIS	2.57	3.01	105.85	✗	✗	19[N3]	3038[O2]
12	305A	HIS	3.16	3.49	101.63	✗	✗	17[O3]	3038[O2]

2.1.2. Comparaison des résultats in silico et in vitro de K et ΔG :

Tableau 69 : Comparaison des résultats in silico et in vitro de K et ΔG.

Composants	In vitro		In silico	
	K(mol-1)	ΔG(Kj.mol-1)	K(mol-1)	ΔG(Kj.mol-1)
Silybin A	462.22	-14.75	11234.5	-23.11
Silybin B			26168.5	-25.20
Acarbose	6,9078	-21,9186	234, 36	-13,52

La comparaison montre que les résultats de K et ΔG obtenus in silico pour les composés (Silybine A et Silybine B) et le médicament standard (interaction des composés et de l'acarbose avec l'enzyme alpha-amylase) sont proches de ceux obtenus in vitro (interaction des composés et de l'acarbose avec la protéine BSA).

Discussion

La discussion des résultats a montré que l'extraction des graines de *Echinops spinosissimus* à l'aide d'un mélange hydroéthanolique a donné un rendement élevé de 15,855 %, indiquant une richesse importante en composés extractibles, notamment les composés polaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins. Ce rendement peut être expliqué par l'efficacité du solvant utilisé ainsi que par la richesse de la composition chimique intrinsèque des graines. De plus, la comparaison avec l'étude de Jahan et al. (2016) a montré que l'utilisation du méthanol et de l'éthanol a conduit à des rendements plus faibles, respectivement de 11,2 % et 6,7 %, ce qui met en évidence l'efficacité du système hydroéthanolique pour l'extraction des composés bioactifs de manière plus sûre et plus respectueuse de l'environnement. L'analyse phytochimique a également révélé la présence d'un large éventail de métabolites secondaires, principalement les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les saponines, les terpénoïdes, les coumarines et les stéroïdes. Ces composés présentent une grande importance biologique, notamment les

Chapitre II: Résultats et discussion

polyphénols, les flavonoïdes et les tanins, connus pour leur implication dans la régulation de la glycémie et l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, ainsi que pour leur rôle dans la réduction du stress oxydatif associé au diabète. Par ailleurs, la présence d'alkaloïdes, de saponines et de terpénoïdes pourrait contribuer à l'inhibition des enzymes digestives des glucides telles que l' α -amylase et l' α -glucosidase, réduisant ainsi l'élévation de la glycémie postprandiale. Bouzabata et al. (2018) ont également rapporté la présence de plusieurs métabolites secondaires dans *Echinops spinosus*, notamment les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins et les saponines, ainsi que des sesquiterpénoïdes et des stérols tels que le β -sitostérol et le stigmasterol, connus pour leurs propriétés biologiques associées à l'amélioration du métabolisme et à la régulation de l'hyperglycémie. La richesse en composés phénoliques et en tanins soutient ainsi le potentiel thérapeutique de cette plante dans le domaine antidiabétique. D'autre part, la silymarine est reconnue comme l'un des composés végétaux importants possédant des propriétés antidiabétiques, en raison de sa richesse en flavonoïdes et en composés phénoliques contribuant à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et à la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Shah et al., 2011 ; Shah et al., 2013). De son côté, *E. spinosissimus* présente également ces mêmes familles chimiques essentielles, avec une diversité plus importante de certains métabolites secondaires tels que les alcaloïdes et les saponines, ce qui renforce l'hypothèse de son potentiel biologique dans le contrôle des troubles glycémiques. Notre étude a également révélé une teneur élevée en polyphénols totaux de $92,543 \pm 0,002$ mg équivalent acide gallique/g d'extrait. En comparaison, l'étude de Cheffour (2019) sur *Artemisia campestris* a rapporté des valeurs relativement inférieures lorsqu'elles sont exprimées par gramme, ce qui confirme la richesse de *E. spinosissimus* en composés phénoliques biologiquement actifs. La teneur en flavonoïdes a atteint 1,862 mg équivalent rutine/g d'extrait, ces composés étant largement associés, dans plusieurs études, à des activités impliquées dans la régulation de la glycémie et l'amélioration du métabolisme. Enfin, les résultats montrent que les variations de la composition chimique des plantes dépendent de plusieurs facteurs, notamment l'espèce végétale, la partie utilisée et la méthode d'extraction. Néanmoins, la richesse remarquable en composés phénoliques, flavonoïdes et tanins fait de *Echinops spinosissimus* une source naturelle prometteuse de composés à potentiel antidiabétique, ce qui nécessite des études complémentaires afin d'identifier précisément les composés actifs et leurs mécanismes d'action.

Concernant l'activité antioxydante, l'extrait a présenté une activité de piégeage des radicaux DPPH avec une IC_{50} de 0,320 mg/mL, inférieure à celle de l'acide ascorbique (0,0069 mg/mL), mais témoignant néanmoins de la présence de composés actifs capables de

Chapitre II: Résultats et discussion

réduire le stress oxydatif. Ces résultats concordent avec des études antérieures. Bouzabata et al. (2018) ont montré qu'un extrait d'acétate d'éthyle des parties aériennes de *E. spinosus*, riche en tanins condensés, présentait une forte activité antioxydante dans le test DPPH ($IC_{50} = 8,25 \mu\text{g/mL}$), supérieure à celle des racines ($23 \mu\text{g/mL}$). De même, Khedher et al. (2014) ont rapporté une activité antioxydante modérée d'un extrait éthanolique ($IC_{50} = 147 \mu\text{g/mL}$), mettant en évidence une corrélation positive entre la teneur en tanins et le pouvoir antioxydant. Dans l'ensemble, ces données confirment que les polyphénols, et plus particulièrement les tanins, constituent les principaux contributeurs de l'activité antioxydante de *E. spinosissimus*. Bien que son efficacité reste inférieure à celle de l'acide ascorbique, la présence notable de ces composés confère à l'extrait un potentiel biologique et préventif intéressant, faisant de cette espèce une source prometteuse d'antioxydants naturels à application pharmacologique.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait de *Echinops spinosissimus* ont montré une efficacité variable selon les souches bactériennes testées, avec des diamètres de zones d'inhibition compris entre 9 et 16 mm, ainsi que des valeurs de CMI/ IC_{50} hétérogènes reflétant des degrés de sensibilité différents. Les bactéries à Gram positif, notamment *Enterococcus faecalis* et *Bacillus subtilis*, ont présenté la plus forte sensibilité, indiquant une activité inhibitrice marquée de l'extrait. *Staphylococcus aureus* a montré une activité modérée, tandis que les bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella/Pseudomonas* ont révélé une résistance relative, bien qu'une inhibition variable ait été observée, probablement en lien avec leurs mécanismes intrinsèques de résistance, probablement via des interactions avec la paroi cellulaire ou des perturbations des fonctions métaboliques essentielles. La comparaison avec l'étude de Zitouni Amel (2017) montre une concordance générale des résultats avec ceux obtenus pour d'autres extraits végétaux, avec toutefois des variations attribuées au solvant d'extraction, à la concentration des composés actifs et aux différences géographiques. Dans certains cas, les résultats de notre étude apparaissent comparables voire légèrement supérieurs malgré l'utilisation de concentrations plus faibles, ce qui souligne l'intérêt qualitatif de l'extrait. Globalement, ces résultats indiquent que *Echinops spinosissimus* possède une activité antibactérienne modérée mais prometteuse, suggérant son potentiel en tant que source naturelle de composés bioactifs susceptibles d'être exploités dans le développement de compléments ou d'agents thérapeutiques alternatifs, notamment face à l'augmentation de la résistance aux antibiotiques conventionnels.

Chapitre II: Résultats et discussion

L'extrait a montré une capacité significative à inhiber l'enzyme α -amylase, une cible essentielle dans le contrôle de l'hyperglycémie postprandiale. La valeur de l' IC_{50} de l'extrait a été déterminée à $0,983 \pm 0,012$ mg/mL, valeur nettement supérieure à celle de la substance de référence, l'acarbose, qui a présenté une IC_{50} de $0,1902 \pm 0,015$ mg/mL (Chiasson et al., 2002). Bien que l'efficacité de l'extrait demeure inférieure à celle de l'acarbose, cette activité inhibitrice notable suggère la présence de composés bioactifs capables de moduler le métabolisme des glucides et pouvant ainsi contribuer au contrôle du diabète (Lebovitz, 1997). Une étude antérieure menée par Benrahou et al. (2022) a évalué le pouvoir inhibiteur des extraits d'*Echinops spinosus* vis-à-vis de l'enzyme α -amylase, une enzyme clé localisée au niveau de la bordure en brosse intestinale et responsable de l'hydrolyse finale des oligosaccharides en glucose afin de permettre leur absorption. Les résultats ont montré que l'extrait éthanolique préparé par macération présentait une inhibition marquée de l'enzyme, avec une valeur d' IC_{50} de $18,6 \pm 1,2$ μ g/mL, tandis que l'extrait aqueux affichait une activité légèrement plus faible ($IC_{50} = 19,68 \pm 0,46$ μ g/mL). Il convient de souligner que l'activité inhibitrice de l'extrait éthanolique était proche de celle de l'acarbose utilisé en clinique ($IC_{50} = 18,01 \pm 2,00$ μ g/mL) (Chiasson et al., 2002). L'inhibition de l'enzyme α -amylase observée dans les extraits d'*E. spinosus* serait principalement attribuée à leurs composés phénoliques, connus pour leur capacité à interagir avec l'enzyme et à entraver son activité catalytique. Ces résultats suggèrent qu'*E. spinosus* représente une stratégie thérapeutique naturelle prometteuse dans le contrôle de l'hyperglycémie postprandiale et potentiellement dans la prévention du diabète de type 2. L'acarbose est un inhibiteur des enzymes digestives des glucides, agissant principalement sur l' α -amylase et les α -glucosidases intestinales, ce qui permet de ralentir la digestion des glucides complexes et de réduire l'absorption du glucose, limitant ainsi les pics glycémiques postprandiaux (Lebovitz, 1997). Dans ce contexte, l'activité de l'extrait d'*E. spinosus* suggère un mécanisme d'action similaire à celui de l'acarbose, renforçant son potentiel en tant qu'agent naturel régulateur de la glycémie. Les prédictions in silico ont confirmé les résultats expérimentaux. En effet, l'étude de docking moléculaire réalisée par Benrahou et al. (2022) a révélé une forte affinité des composés Silybin A et Silybin B pour l'enzyme α -amylase. Des valeurs très négatives de l'énergie libre de liaison (ΔG) ont été obtenues, soit -23,11 et -25,20 kJ/mol, respectivement, supérieures à celle de l'acarbose (-13,52 kJ/mol). D'un point de vue académique, la diminution de l'énergie libre de liaison indique une formation spontanée et thermodynamiquement stable du complexe enzyme–ligand. Par ailleurs, les valeurs élevées de la constante d'affinité (K), notamment pour la Silybin B (26168,5), confirment l'existence d'interactions fortes au niveau du site actif

Chapitre II: Résultats et discussion

de l'enzyme, incluant des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle ces flavonolignanes constituent des contributeurs majeurs de l'activité antidiabétique observée *in vitro*. L'ensemble de ces résultats met en évidence une concordance remarquable entre les données expérimentales et théoriques. La performance de l'extrait dans les tests biologiques peut être expliquée par la stabilité énergétique élevée des molécules de silybine lors de leur interaction avec l'enzyme cible (Murray et al., 2018). Ainsi, *Echinops spinosissimus* peut être considéré comme une source prometteuse de composés bioactifs susceptibles de constituer une alternative naturelle ou un complément thérapeutique à des médicaments tels que l'acarbose, notamment grâce à leur capacité à inhiber l'enzyme à de faibles concentrations (inférieures à 0,1 mg/mL).

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour le développement de compléments alimentaires ou de préparations phytothérapeutiques destinées à la prise en charge du diabète de type 2, avec un minimum d'effets secondaires.

Les résultats de cette étude montrent que l'extrait de *Echinops spinosissimus* exerce un effet stimulant significatif sur l'activité phagocytaire des cellules immunitaires, de manière dose-dépendante, avec un effet maximal observé à la concentration la plus élevée (5), où les valeurs obtenues varient entre 17 et 20. Cette augmentation suggère une amélioration notable de la fonction des cellules phagocytaires, probablement liée à la richesse de l'extrait en composés phénoliques et flavonoïdes possédant des propriétés immunomodulatrices. La comparaison avec le zinc, utilisé comme référence, met en évidence une supériorité de l'extrait, notamment aux faibles et moyennes concentrations, tandis que le zinc n'atteint des valeurs proches du témoin qu'à forte concentration, sans égaler l'efficacité de l'extrait. Cela indique que l'extrait présente une capacité plus efficace et plus constante à stimuler la phagocytose que cet oligo-élément essentiel. Sur le plan mécanistique, cet effet pourrait être attribué à l'activation des voies de signalisation immunitaire, à l'augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à la surexpression de récepteurs de reconnaissance tels que les Toll-like receptors (TLR), facilitant ainsi la reconnaissance et l'élimination des agents pathogènes.

Bien que le zinc joue un rôle fondamental dans le maintien des fonctions immunitaires innées et adaptatives, son efficacité reste inférieure dans les conditions expérimentales étudiées.

Les résultats de cette étude montrent que l'extrait aqueux/méthanolique des graines d'*Echinops spinosissimus* présente une activité anti-inflammatoire notable, proche de celle du diclofénac, un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) de référence agissant principalement

Chapitre II: Résultats et discussion

par inhibition des enzymes COX-1 et COX-2, entraînant une diminution de la synthèse des prostaglandines impliquées dans la douleur et l'inflammation. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs (Dorjay et al., 2018) ayant démontré les effets anti-inflammatoires de la silymarine via plusieurs mécanismes. Globalement, *E. spinosissimus* apparaît comme un candidat naturel prometteur, susceptible d'exercer des effets comparables au diclofénac en modulant les médiateurs et voies inflammatoires, notamment via l'inhibition de COX-2, suggérant ainsi un potentiel développement comme alternative ou complément thérapeutique naturel. Les analyses in silico (docking moléculaire) ont confirmé une interaction stable et spontanée entre les composés de la plante et la COX-2, mise en évidence par des valeurs négatives de l'énergie libre de liaison (ΔG). Les composés actifs induisent des modifications conformationnelles de l'enzyme via des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques, hydrophobes et ioniques avec les acides aminés du site actif, selon un mode d'interaction similaire à celui des médicaments standards. L'énergie d'interaction des graines d'*E. spinosissimus* (-15,154 kJ/mol) est proche de celle du diclofénac (-16,67 kJ/mol), confirmant une affinité comparable pour la COX-2, tandis que la prednisolone présente une affinité plus élevée (-23,45 kJ/mol). La concordance entre les résultats in vitro et in silico, associée aux données ADMET favorables (absence de toxicité majeure prédite), renforce l'hypothèse d'un profil pharmacologique intéressant. Ainsi, *E. spinosissimus* se positionne comme une source potentielle de composés bioactifs anti-inflammatoires, agissant principalement par inhibition de la COX-2 et réduction de la synthèse des prostaglandines, ce qui soutient son intérêt en tant que candidat thérapeutique naturel prometteur.

Les résultats de cette étude in vitro ont mis en évidence une efficacité élevée de l'extrait d'*Echinops spinosissimus* dans la protection de la muqueuse gastrique, en utilisant le modèle de la « barrière mucilagineuse », basé sur la simulation des mécanismes naturels de défense de l'estomac contre des agents irritants tels que l'éthanol et l'acide chlorhydrique (HCl). Les mesures spectrophotométriques (UV-Visible) ont révélé une relation dose-effet étroite entre la concentration de l'extrait et le pourcentage de protection. En effet, le taux de protection est passé de 87,72 % à 0,2 mg/mL pour atteindre un maximum de 97,86 % à 2 mg/mL, traduisant une réponse dose-dépendante nette. Ce comportement suggère la capacité des composés actifs de l'extrait à renforcer la stabilité de la matrice mucilagineuse et à limiter sa dégradation sous stress chimique, en accord avec les observations d'Allen et al. (1993) concernant le rôle protecteur du mucus gastrique. Sur le plan quantitatif, la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) constitue un paramètre clé, l'extrait présentant une valeur très faible de 0,006 mg/mL. La comparaison avec les composés de référence montre une supériorité marquée de l'extrait

Chapitre II: Résultats et discussion

naturel : l'alginate présente une IC_{50} de 0,615 mg/mL, tandis que le lansoprazole varie entre 0,653 et 0,791 mg/mL, et le médicament Antag entre 0,765 et 0,992 mg/mL. Cette différence, où l' IC_{50} de l'extrait est environ cent fois inférieure à celle des traitements de référence, confirme une forte activité protectrice à très faibles concentrations, suggérant un potentiel prometteur comme candidat thérapeutique naturel. Ces résultats concordent avec les travaux ayant démontré l'implication des composés phénoliques et flavonoïdes dans la prévention des ulcères gastriques et la réduction du stress oxydatif associé (Sumbul et al., 2011). Par ailleurs, l'analyse comparative des courbes dose-réponse indique une réponse plus rapide de l'extrait aux faibles concentrations. Bien que le lansoprazole soit un inhibiteur de la pompe à protons de référence, l'extrait a montré une protection de 87,72 % à 20 mg/mL contre 58,85 % pour le lansoprazole à 25 mg/mL. L'extrait a également surpassé l'alginate et Antag à l'ensemble des concentrations testées, ces derniers présentant des effets plus modérés et progressifs. La fiabilité des résultats est renforcée par les coefficients de corrélation obtenus ($R^2 \approx 0,98$ pour les références et 0,806 pour l'extrait lors des essais préliminaires). Sur le plan mécanistique, l'effet gastroprotecteur est attribué à la présence probable de mucilages et/ou de composés phénoliques capables de former une barrière physique protectrice limitant la diffusion des ions H^+ vers l'épithélium gastrique. Ce mécanisme est comparable à celui de l'alginate, connu pour former une couche gélifiée protectrice de la muqueuse gastrique contre l'acidité et les agents irritants. Toutefois, l'extrait végétal présente une efficacité supérieure, suggérant un mécanisme protecteur analogue mais plus performant. En conclusion, cette étude démontre que l'extrait possède une activité anti-ulcéreuse notable, dépassant celle des références utilisées dans les modèles *in vitro*, ce qui ouvre des perspectives prometteuses pour son utilisation dans le traitement des pathologies gastro-intestinales. Néanmoins, des études *in vivo* restent nécessaires afin de confirmer ces résultats et d'élucider davantage les mécanismes moléculaires impliqués.

Les résultats expérimentaux montrent une très forte efficacité inhibitrice de l'extrait végétal vis-à-vis du processus de glycation, l'extrait ayant enregistré le taux d'inhibition le plus élevé de 97,8692 % à une concentration de 2 mg/mL. Ces mesures s'inscrivent dans une étude *in vitro* visant à évaluer le potentiel de l'extrait à inhiber la formation des produits terminaux de glycation avancée (AGEs) en utilisant le modèle BSA-glucose, un mécanisme impliqué dans de nombreuses complications biochimiques chroniques associées au diabète (Rahbar, 2005). Par ailleurs, en considérant l'efficacité biologique à travers la valeur de la concentration inhibitrice moyenne (IC_{50}), l'extrait a présenté une activité remarquable avec une valeur de 0,067 mg/mL. Dans le même contexte, la comparaison avec les standards a

Chapitre II: Résultats et discussion

révélé que l'extrait possède une capacité inhibitrice supérieure à celle de la metformine, qui a enregistré une valeur d'IC₅₀ de 0,072 mg/mL, tandis que la quercétine demeure le composé de référence le plus puissant avec la plus faible concentration inhibitrice moyenne, soit 0,008 mg/mL. Ces résultats concordent avec les études rapportant le rôle des antioxydants naturels dans l'inhibition de la formation des composés fluorescents et des AGEs (Reddy & Beyaz, 2006). Sur le plan statistique, les valeurs élevées du coefficient de détermination (R²), comprises entre 0,95 et 0,984, confirment la précision et la fiabilité des résultats obtenus ainsi que la qualité de la relation entre l'augmentation de la concentration et l'élévation du pourcentage d'inhibition. En conclusion, cette étude démontre que l'extrait possède des propriétés prometteuses en tant qu'inhibiteur naturel de la glycation ; les composés phénoliques présents dans l'extrait contribuent à empêcher l'interaction entre les sucres réducteurs et les groupements aminés des protéines (Peng et al., 2011). Bien que son efficacité demeure inférieure à celle de la quercétine en tant que composé pur, sa supériorité par rapport à la metformine ouvre des perspectives importantes quant à son utilisation potentielle comme source naturelle de composés protecteurs contre les complications métaboliques.

Les résultats du de l'interaction entre l'extrait de *Echinops spinosissimus* et la sérum-albumine bovine (BSA) ont révélé une augmentation progressive et significative du pourcentage de liaison parallèlement à l'élévation de la concentration de l'extrait, les valeurs passant de 11,74 % à la concentration de 0,1 mg/mL jusqu'à 78,04 % à 1 mg/mL. Ces résultats traduisent clairement une forte affinité de liaison entre les composés bioactifs présents dans l'extrait et les sites de liaison de la BSA, conduisant ainsi à la formation de complexes stables de type protéine–ligand. Dans le même contexte, les analyses spectrophotométriques ont mis en évidence des variations marquées de l'absorbance à 280 nm, longueur d'onde associée aux résidus aromatiques de la protéine, notamment le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine, ce qui concorde avec les observations rapportées par Lakowicz (2006) concernant la sensibilité de ces résidus aux modifications conformationnelles induites par les interactions protéine–ligand. À partir de ces observations, il peut être déduit que les constituants de l'extrait établissent des interactions moléculaires directes avec la protéine, reposant principalement sur des interactions non covalentes incluant les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes, reconnues pour leur rôle dans la stabilisation des complexes protéines–polyphénols, comme l'ont rapporté Dufour et al. (2005). Par ailleurs, l'analyse quantitative a montré une augmentation notable du taux de liaison avec l'accroissement de la concentration de l'extrait, le pourcentage maximal d'interaction étant enregistré à 1 mg/mL. La concentration efficace (CE₅₀) a été estimée à

Chapitre II: Résultats et discussion

0,3702 mg/mL avec un coefficient de corrélation élevé ($R^2 = 0,95$), indiquant une relation dose-effet forte et bien corrélée. En outre, l'étude thermodynamique a révélé une valeur négative de l'énergie libre de Gibbs ($\Delta G = -18,03 \text{ kJ.mol}^{-1}$), suggérant que le processus de liaison se déroule spontanément et présente une stabilité thermodynamique favorable. De plus, la valeur de la constante de liaison ($K = 1,442 \text{ M}^{-1}$) confirme la stabilité du complexe formé entre les composés actifs de l'extrait et la BSA, renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle les composés phénoliques et flavonoïdes possèdent une capacité importante de liaison aux protéines de transport dans le milieu biologique. Par conséquent, cette interaction pourrait contribuer à améliorer le transport ainsi que la biodisponibilité des molécules bioactives dans l'organisme, soutenant ainsi le potentiel biologique et pharmacologique de l'extrait de *Echinops spinosissimus*, notamment en relation avec ses activités antioxydante et antihyperglycémiant.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

La présente étude a permis une exploration approfondie des propriétés phytochimiques et biologiques des graines de *Echinops spinosissimus*, à travers une approche intégrée reposant sur des analyses in vitro et des simulations in silico.

Les résultats obtenus ont mis en évidence une activité antioxydante remarquable de l'extrait, traduisant sa forte capacité à neutraliser les radicaux libres. Des activités pharmacologiques importantes ont également été démontrées, notamment une activité anti-inflammatoire, une activité antidiabétique via l'inhibition de l' α -amylase et du processus de glycation, ainsi qu'un effet gastroprotecteur prometteur contre l'ulcère gastrique. Par ailleurs, l'étude des interactions moléculaires avec la protéine BSA a révélé une forte affinité entre les composés bioactifs et la protéine, suggérant une bonne stabilité biologique et une capacité de liaison efficace. Le test de phagocytose a également mis en évidence une capacité significative de l'extrait à moduler la réponse immunitaire, reflétant ainsi un intérêt Immunopharmacologique notable.

Les résultats expérimentaux ont aussi révélé une activité antibactérienne de l'extrait, mise en évidence par l'inhibition de la croissance de certaines souches bactériennes étudiées, confirmant ainsi son potentiel antimicrobien et contribuant à renforcer ses propriétés thérapeutiques ainsi que l'étendue de son activité biologique.

En outre, les analyses computationnelles, notamment le docking moléculaire et les prédictions ADME via SwissADME, ont soutenu ces résultats en confirmant le profil pharmacocinétique favorable ainsi que la forte affinité des composés actifs envers les cibles biologiques étudiées.

Cependant, la valorisation de cette ressource naturelle nécessite la poursuite des recherches scientifiques, notamment l'isolement et la caractérisation structurale des composés actifs à l'aide de techniques analytiques avancées telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse. Une évaluation toxicologique approfondie à l'aide d'outils spécialisés comme ProTox demeure également indispensable afin de garantir la sécurité d'utilisation. De plus, des études in vivo sont nécessaires pour confirmer l'efficacité thérapeutique et permettre le développement de formulations pharmaceutiques stables et efficaces.

Enfin, une exploitation durable et rationnelle de cette espèce apparaît essentielle afin de préserver cette ressource naturelle prometteuse tout en ouvrant de nouvelles perspectives pour ses futures applications thérapeutiques et cliniques.

Liste des références

Liste des références

A

Abdul Majid, G., Hijazi, M. A., El Lakany, A., & Aboul Ela, M. (2024). Variations in volatile oil constituents of *Echinops* species growing in the Middle East and the Mediterranean regions: Mini review.

Adaika, A., Lanez, T. E. (2019). In vitro and in silico evaluation of anticancer activity of N, N-dimethylaminomethylferrocene. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 11(2), 748-768.

Ahmedou, A. (2021). Conception de nouveaux inhibiteurs de 3CLpro-SARS-CoV-2 par approche in silico [Mémoire de master]. Université Mohammed V-Rabat.

Akhter, S., Hossain, M. W., Sultana, S., et al. (2022). *Ruellia prostrata* Poiré: Activité évaluée par les phytoconstituants, activité antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne, et in silico fonctions moléculaires. *Journal of Saudi Chemical Society*, 26(1), 101401.

Akroum, S. (2011). Étude analytique et biologique des flavonoïdes naturels [Thèse de doctorat, Université Mentouri de Constantine].

Al Masoudi, L. M., & Hashim, A. M. (2023). Morphological features and biological activity of different extracts of *Echinops spinosissimus* grown in Saudi Arabia. *Agronomy*, 13(2), 573.

Ali, H., Houghton, P. J., & Soumyanath, A. (2013). α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3), 449–455.

Allen, A., Flemström, G., Garner, A., & Kivilaakso, E. (1993). Gastroduodenal mucosal protection. *Physiological Reviews*, 73(4), 823–857.

Ambarwati, N. S. S., Armandari, M. O., Widayat, W., et al. (2022). In vitro studies on the cytotoxicity, elastase, and tyrosinase inhibitory activities of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) extract. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 13(3), 182-186.

Arrault, A. (2007). Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données.

Azab, A., Nassar, A., & Azab, A. N. (2016). Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules*, 21(10), 1321.

B

Bahi, A. (2015). L'effet protecteur des antioxydants naturels dans l'intoxication du mercure chez le rat Albinos Wistar [Thèse de doctorat, Université des Frères Mentouri-Constantine].

Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., & Preissner, R. (2018). ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W257–W263.

Conclusion Générale

Baudouin, A. (2012). La spectroscopie. Université Lyon 1, CEPEC.

Benbahmed, N., & Outaleb, S. (2018). Étude comparative de quelques herbes aromatiques commercialisées en Algérie en utilisant des méthodes analytiques et chimiométriques [Mémoire de master]. Université A. Mira – Béjaïa.

Benrahhou, K., et al. (2022). Acute toxicity, phenol content, antioxidant and postprandial anti-diabetic activity of *Echinops spinosus* extracts. *International Journal of Secondary Metabolite*, 9(1), 91-102.

Benyahia, S., Mekkiou, R., Benayache, S., & Benayache, F. (2016). Flavonoids from ethyl acetate extract of *Echinops spinosus* (Asteraceae). *Der Pharma Chemica*, 8(8), 159.

Bitew, H., & Hymete, A. (2019). The genus *Echinops*: Phytochemistry and biological activities: A review.

Boumaraf, M., Benyahia, S., Mekkiou, R., Benayache, S., & Benayache, F. (2016). Flavonoids from ethyl acetate extract of *Echinops spinosus* (Asteraceae). *Der Pharma Chemica*, 8(8), 159.

C

Cheffour, K. (2019). Étude phytochimique et évaluation des activités biologiques des extraits d'*Echinops spinosus* de la région de Tlemcen [Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen].

Chiasson, J. L., et al. (2002). Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *The Lancet*, 359(9323), 2072–2077.

Copeland, R. A., et al. (1994). Mechanism of selective inhibition of the cyclooxygenase isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23), 11202–11206.

D

Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13.

Dar, A. M., & Mir, S. (2017). Molecular docking: approaches, types, applications and basic challenges. *J Anal Bioanal Tech*, 8(2), 1-3.

Dias, M. C., Pinto, D. C., & Silva, A. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), 5377.

Dufour, D., et al. (2005). Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(1–2), 171–176.

E

Elseragy, M. A., et al. (2024). An updated review of the ethnopharmacological uses, phytochemistry and selected biological activities of genus *Echinops* L. *Egyptian Journal of Chemistry*.

F

Forli, S., et al. (2016). Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, 11(5), 905-919.

G

Gheffour, K. (2019). Étude phytochimique et évaluation des activités biologiques de plantes médicinales sahariennes [Mémoire de master/Thèse, Université Kasdi Merbah Ouargla].

Gillessen, A., & Schmidt, H. H.-J. (2020). Silymarin as supportive treatment in liver diseases: A narrative review. *Advances in Therapy*, 37, 1279–1301.

I

Ibrahim, H., & Ouazine, Y. (2014). Utilisation de la spectrophotométrie UV-visible pour l'étude de l'extraction solide-liquide du thym [Mémoire de master]. Université A. Mira – Béjaïa.

L

Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3rd ed.). Springer.

Lebovitz, H. E. (1997). Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 26(3), 539–551.

M

Matsuura, N., et al. (2002). Screening system for the Maillard reaction inhibitor from natural product extracts. *Journal of Health Science*, 48(6), 520–526.

Murray, R. K., et al. (2018). *Harper's Illustrated Biochemistry* (31st ed.). McGraw-Hill Education.

P

Peng, X., et al. (2011). The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. *Food Chemistry*, 119(1), 49–53.

R

Rahbar, S. (2005). The discovery of glycation and its role in disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043, 1–9.

Reddy, V. P., & Beyaz, A. (2006). Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discovery Today*, 11(13–14), 646–654.

S

Sumbul, S., et al. (2011). Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(3), 361–367.

W

Wallace, J. L. (2008). Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: Why doesn't the stomach digest itself? *Physiological Reviews*, 88(4), 1547–1565.