

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Badji Mokhtar Annaba university
Université Badji Mokhtar Annaba



جامعة باجي مختار - عنابة

Faculté des sciences
Département de Biochimie
Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **Doctorat en Sciences**

Option

Biochimie Appliquée

Thème

Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie.

Par : **BOUDJELAL Amel**

Devant le jury

KIRANE D.
HENCHIRI C.
SOLTANE M.
LEHOUEL M.
BORDJIBA O.
ZELLAGUI A.

Pr. Univ. Badji- Mokhtar
Pr. Univ. Badji- Mokhtar
Pr. Univ. d'El Tarf
Pr. Univ. Jijel
Pr. Univ. Badji- Mokhtar
Pr. Univ. d'Oum-El-Bouaghi

Président
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

Année Universitaire : 2012 - 2013

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Badji Mokhtar Annaba university
Université Badji Mokhtar Annaba



جامعة باجي مختار - عنابة

Faculté des sciences
Département de Biochimie
Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **Doctorat en Sciences**

Option

Biochimie Appliquée

Thème

Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie.

Par : **BOUDJELAL Amel**

Devant le jury

KIRANE D.	Pr. Univ. Badji- Mokhtar	Président
HENCHIRI C.	Pr. Univ. Badji- Mokhtar	Rapporteur
SOLTANE M.	Pr. Univ. d'El Tarf	Examineur
LEHOUEL M.	Pr. Univ. Jijel	Examineur
BORDJIBA O.	Pr. Univ. Badji- Mokhtar	Examineur
ZELLAGUI A.	Pr. Univ. d'Oum-El-Bouaghi	Examineur

Année Universitaire : 2012 - 2013

DEDICACE

*Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude
et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.*

A frères Mohamed Amine et Hichem.

A mon frère Chemseddine, sa femme Chahnez et leurs filles Yasmine, Racha et

Imene.

A ma sœur Lamia, son mari Abdelaziz et leurs enfants Hiba, Minna et Azeddine

A mon mari Kameleddine et mon fils Samy Isleme

REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement madame Cherifa HENCHIRI, ma directrice de thèse, et lui exprime toute ma reconnaissance de m'avoir accueillie dans son équipe avec gentillesse et bienveillance, ainsi que pour ses qualités pédagogiques et l'enthousiasme communicatif dont elle sait faire preuve. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle d'avoir pu bénéficier de ses conseils.

J'exprime mes remerciements les plus sincères au Docteur Giuseppe RUBERTO et au Docteur Laura SIRACUSA de l'Institut de Chimie Biomoléculaire de Catania (ICB Catania /Italie) pour leur soutien et pour le temps qu'ils ont pu consacrer dans l'identification phytochimique des différents extraits qui ont fait l'objet d'une partie de ce travail de thèse.

Je remercie en particulier le Docteur Roberto ZENA de la Faculté de Pharmacie (Université de Messine/Italie) pour leur aide concernant la réalisation de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques.

Un grand merci au Docteur Zoubir HARRAT et au madame Nawel EDDAIKRA de l'Institut Pasteur Algérie (Laboratoire Ecoépidémiologie Parasitaire/ Dely Ibrahim Alger) pour l'incalculable aide dans la réalisation des tests de l'activité leishmanicide.

Mes sincères remerciements vont au Professeur Djamilia KIRANE d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

J'aimerais également remercier le r Mesbah LEHOUEL, Université Mohamed Seddiki Ben Yahia/Jijel, le Professeur Ouahiba BORDJIBA, Université Badji Mokhtar/ Annaba et le Professeur Ammar ZELLAGUI, Université Oum El Bouaghi, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Merci aussi mes collègues : Madani SARI, Noui HENDEL, Abdelkader CHERIEF, Djamel SARRI, Nourreddine MERNIZ, Abderrahim BENKHALED, Abdelkrim BOUDRISSA, Kamel SEGHIRI et Smail SERTI pour leurs aide et conseils tout le long de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier mes ex-étudiants devenus aujourd'hui collègues : Faiza BAALI et Omar KERMICHE.

RESUME

Le but de cette étude est de contribuer à la valorisation et la protection de la flore médicinale de la région de M'Sila. Les enquêtes ethnobotaniques auprès des herboristes de la région ont permis d'inventorier 58 plantes spontanées dont la majorité est utilisée comme antidiabétique. Parmi ces espèces, *Artemisia herba alba*, *Ajuga iva* et *Marrubium vulgare*, ont été retenues pour cette étude.

L'analyse qualitative et quantitative par LC-UV-vis-DAD-ESI-MS, a permis de constater la richesse des extraits aqueux et méthanoliques en principes actifs, en particulier polyphénols et flavonoïdes dans les extraits de l'*Artemisia herba alba* et du *Marrubium vulgare*, alors que l'*Ajuga iva* pauvre en ces composés, est riche en iridoïdes.

L'étude biologique a montré que les extraits des trois espèces possèdent des effets antidiabétique, antioxydants, leishmanicide et antimicrobien avec des différences au niveau de la puissance de ces effets. L'*Artemisia herba alba*, à la dose de 300 mg/Kg p.c. a entraîné le pourcentage de réduction le plus important de la glycémie (73.88 %) ; le *Marrubium vulgare* c'est révélé avoir le meilleur effet antioxydant avec une IC50/DPPH de 0.49 mg/ml.

Pour les activités leishmanicide, l'IC50 la plus élevée a été obtenue avec le *Marrubium vulgare* (25 µg/ml) suivi par *Artemisia herba alba* et *Ajuga iva* (10 µg/ml) ; alors que pour les activités antimicrobiennes, l'*Artemisia herba alba* s'est avéré être un bon agent antimicrobien vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* avec un diamètre d'inhibition de 18 et 15 mm respectivement comparé aux deux autres espèces.

Mots clés : Phytothérapie, LC-UV-vis-DAD-ESI-MS, antidiabétique, antioxydant, leishmanicide, antimicrobien.

ملخص

الغرض من هذه الدراسة هو المساهمة في تعزيز وحماية النباتات الطبية في منطقة "المسيلة". البحث الاستقصائي الاثنونباتي لدى عشابي المنطقة سمح بجدد 58 نبتة عفوية حيث معظمها تستخدم مضادة لمرض السكري. ومن بين هذه النباتات، تم اختيار *Artemisia herba alba* ، *Ajuga iva* و *Marrubium vulgare* لهذه الدراسة.

أظهر التحليل النوعي والكمي باستعمال LC-UV-vis-DAD-ESI-MS ثراء المستخلصات المائية و الميثانولية بالمكونات الفعالة، خاصة البوليفينول والفلافونيدات في مستخلصات *Artemisia herba alba* و *Marrubium vulgare*، أما *Ajuga iva* التي تفتقر لهذه المركبات، فهي غنية بالايرويدات.

أظهرت الدراسة البيولوجية أن مستخلصات النباتات الثلاثة تمتلك مفعول مضاد لداء السكري، مضاد للأكسدة، مضاد للجراثيم و مضاد الليشمانيات مع وجود اختلافات في قوة هذا التأثير. أدت *Artemisia herba alba* ، بجرعة 300 ملغ/ كغ من وزن الجسم إلى إعطاء أهم نسبة تخفيض للسكر في الدم (88,73%) ; أما *Marrubium vulgare* فإظهار أفضل تأثير مضاد للأكسدة بنسبة IC50/DPPH تقدر ب 0.49 ملغ/مل.

فيما يخص النشاط ضد الليشمانيات، تم الحصول على أعلى IC50 مع *Marrubium vulgare* (25 ملغ / مل) ، يليه *Artemisia herba alba* و *Ajuga iva* (10ميكروغرام/ مل) ، في حين الأنشطة المضادة للميكروبات، ثبت أن *Artemisia herba alba* فقد يكون عامل مضاد للميكروبات جيد تجاه *Staphylococcus aureus* و *Candida albicans* بأقطار تثبيط تقدر ب: 18 و 15 مم على التوالي، مقارنة مع النوعين الآخرين.

الكلمات المفتاحية: طب الاعشاب، LC-UV-vis-DAD-ESI-MS ، مضاد لمرض السكري ، ومضاد للأكسدة، مضاد لليشمانيات، مضاد للميكروبات.

ABSTRACT

The aim of this study is to contribute to the valorization and protection of medicinal flora of M'Sila region. Ethnobotanical surveys with herbalists in the region have allowed an inventory of 58 wild plants, most of which are used as antidiabetic. Among these species, *Artemisia herba alba*, *Ajuga iva* and *Marrubium vulgare*, were selected for this study.

The qualitative and quantitative analysis by LC-UV-vis-DAD-ESI-MS showed the richness of methanolic and aqueous extracts of active ingredients, particularly polyphenols and flavonoids in extracts of *Artemisia herba alba* and *Marrubium vulgare*, then *Ajuga iva* that is poor in these compounds but rich in iridoids.

The biological study showed that extracts of the three species have antidiabetic effects, antioxidant, antimicrobial and leishmanicidal with differences in the strength of these effects. *Artemisia herba alba*, with a dose of 300 mg / kg bw resulted in the highest percentage of reduction of glycemia (73,88%); the *Marrubium vulgare* revealed to have the best antioxidant effect with an IC50/DPPH of 0,49 mg/ml.

For leishmanicidal activity, the highest IC50 was obtained with *Marrubium vulgare* (25 mg/ml) followed by *Artemisia herba alba* and *Ajuga iva* (10 µg/ml); whereas, for the antimicrobial activities, *Artemisia herba alba* can be a good antimicrobial agent against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* with a diameter of inhibition of 18 and 15 mm respectively, compared to the other two species.

Keywords: Phytotherapy, LC-UV-vis-DAD-ESI-MS, antidiabetic, antioxidant, leishmanicidal, antimicrobial.

SOMMAIRE

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION	1
1. IDENTIFICATION BOTANIQUE DES ESPECES VEGETALES ETUDIEES.....	3
1.1. <i>Ajuga iva</i> L.....	3
1.1.1. Description botanique.....	3
1.1.2. Composition chimique	4
1.1.3. Utilisations de la plante.....	4
1.2. <i>Artemisia herba alba</i>.....	4
1.2.1. Description botanique.....	5
1.2.2. Composition chimique.....	5
1.2.3. Utilisations de la plante.....	6
1.3. <i>Marrubium vulgare</i>.....	6
1.3.1. Description botanique.....	6
1.3.2. Composition chimique.....	7
1.3.3. Utilisations de la plante.....	7

MATERIEL ET METHODES

1. Présentation de la zone d'étude.....	8
1.1. Localisation géographique.....	8
1.2. Le sol.....	8
1.3. Climat de la région.....	8
3.1. Les précipitations.....	8
3.2. Les températures.....	10
3.3. Le couvert végétal.....	10
2. Enquête ethnobotanique.....	11
3. Etude phytochimique.....	11
3.1. Méthode d'extraction.....	11
3.2. Analyses qualitatives et quantitatives des extraits de plantes.....	14
3.2.1. Dosage des phénols totaux.....	14
3.2.2. Analyse HPLC/UV-vis-DAD/ESI-MS et HPLC/UV-vis/DAD.....	14
4. Evaluation des activités biologiques.....	16
4.1. Activité antidiabétique.....	16
4.1.1. Matériel végétal et préparation des extraits.....	16
4.1.2. Les animaux.....	16
4.1.3. Induction du diabète.....	16
4.1.4. Protocole expérimental.....	17
4.1.5. Suivi des animaux avant sacrifice.....	18
4.1.6. Dosages biochimiques sanguins après sacrifice.....	18
4.1.6.1. Dosage du glucose.....	18
4.1.6.2. Dosage du cholestérol.....	19
4.1.6.3. Dosage des triglycérides.....	19

SOMMAIRE

4.1.6.4. Dosage des Lipides totaux.....	19
4.1.6.5. Dosage du HDL/LDL.....	20
4.1.6.6. Dosage des protéines totales.....	20
4.1.6.7. Dosage des transaminases TGO/TGP.....	20
4.1.6.8. Dosage de l'urée.....	20
4.1.6.9. Dosage de la créatinine.....	20
4.1.7. Analyse statistique des résultats.....	21
4.2. Activité antioxydante.....	21
4.2.1. Test au DPPH.....	21
4.3. Activité antileishmanienne.....	22
4.3.1. Milieux de culture.....	22
4.3.2. Culture des parasites.....	22
4.3.3. Protocole du test de viabilité sur les promastigotes.....	24
4.4. Activité antibactérienne et antifongique.....	25
4.4.1. Microorganismes utilisés.....	25
4.4.2. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion sur disque).....	25
RESULTATS ET DISCUSSION	
1. Enquête ethnobotanique	27
1.1. Fréquence d'utilisation des plantes médicinales selon le profil des herboristes.....	27
1.1.1. Classes d'âge.....	27
1.1.2. Sexe.....	28
1.1.3. Niveau de scolarisation.....	28
1.2. Fréquence d'utilisation des plantes médicinales.....	29
1.2.1. Domaines d'indication thérapeutique.....	32
1.2.2. Parties utilisées.....	32
1.2.3. Mode de préparation.....	32
2. Etude phytochimique	34
2.1. Taux des phénols totaux.....	34
2.2. Analyse qualitatif et quantitatif des extraits aqueux et méthanoliques.....	35
2.2.1. Analyse qualitatif et quantitative de l'extrait aqueux et méthanolique du <i>Marrubium vulgare</i>	35
2.2.2. Analyse qualitatif et quantitative de l'extrait aqueux et méthanolique d' <i>Artemisia herba alba</i>	40
2.2.3. Analyse qualitatif et quantitative de l'extrait aqueux et méthanolique d' <i>Ajuga iva</i>	43
3. Activités biologiques	47
3.1. Activité antidiabétique.....	47
3.1.1. Activité antidiabétique du <i>Marrubium vulgare</i>	47
3.1.1.1. Effets de l'extrait aqueux sur la glycémie.....	47
3.1.1.2. Effets de l'extrait aqueux sur le poids corporel.....	48
3.1.1.3. Effet de l'extrait aqueux sur les différents paramètres biochimiques.....	49
3.1.2. Activité antidiabétique d' <i>Artemisia herba alba</i>	50
3.1.2.1. Effets de l'extrait aqueux sur la glycémie.....	50
3.1.2.2. Effets de l'extrait aqueux sur le poids corporel.....	52
3.1.2.3. Effet de l'extrait aqueux sur les différents paramètres biochimiques.....	53

SOMMAIRE

3.1.3. Activité antidiabétique d' <i>Ajuga iva</i>	54
3.1.3.1. Effets de l'extrait aqueux sur la glycémie.....	54
3.1.3.2. Effets de l'extrait aqueux sur le poids corporel.....	55
3.1.3.3. Effet de l'extrait aqueux sur les différents paramètres biochimiques.....	56
3.2. Activité antioxydante.....	57
3.3. Activité antileishmanienne.....	58
3.4. Activité antimicrobienne.....	58
CONCLUSION.....	60
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Répartition des moyennes de températures mensuelles en °C.....	10
Tableau II : Composition du régime croquette (ONAB Bejaia).....	16
Tableau III : Plantes médicinales spontanées inventoriées auprès des herboristes de la (W. de M'Sila).....	30
Tableau IV : Domaine d'indication thérapeutique.....	32
Tableau V : Teneur en phénols totaux des différents extraits méthanoliques.....	35
Tableau VI : Liste des métabolites identifiés dans l'extrait aqueux du <i>Marrubium vulgare</i>	38
Tableau VII : Composition des extraits aqueux et méthanolique d' <i>Artemisia herba alba</i>	41
Tableau VIII : Composition de l'extrait aqueux d' <i>Ajuga iva</i>	43
Tableau IX : Composition de l'extrait méthanolique d' <i>Ajuga iva</i>	44
Tableau X : Effet de l'extrait aqueux du <i>Marrubium vulgare</i> sur la glycémie.....	47
Tableau XI : Effet de l'extrait aqueux du <i>Marrubium vulgare</i> sur le poids corporel.....	48
Tableau XII : Paramètres biochimiques après le sacrifice des rats.....	49
Tableau XIII : Effet de l'extrait aqueux d' <i>Artemisia herba alba</i> sur la glycémie.....	51
Tableau XIV : Effet de l'extrait aqueux d' <i>Artemisia herba alba</i> sur le poids corporel.....	52
Tableau XV : Paramètres biochimiques après le sacrifice des rats.....	53
Tableau XVI : Effet de l'extrait aqueux d' <i>Ajuga iva</i> sur la glycémie.....	54
Tableau XVII : Effet de l'extrait aqueux d' <i>Ajuga iva</i> sur le poids corporel.....	55
Tableau XVIII : Paramètres biochimiques après le sacrifice des rats.....	56
Tableau XIX : Activité antioxydante des extraits méthanoliques des 3 plantes.....	57
Tableau XX : IC50 (µg/ml) des extraits méthanoliques des 3 plantes.....	58
Tableau XXI : Activité antimicrobienne des extraits méthanoliques.....	59

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Ajuga iva</i>	3
Figure 2 : <i>Artemisia herba alba</i>	4
Figure 3 : <i>Marrubium vulgare</i>	6
Figure 4 : Localisation géographique de la zone d'étude	9
Figure 5 : Histogramme des moyennes de précipitations mensuelles en mm	10
Figure 6 : Fiche questionnaire modifiée	12
Figure 7 : Extraction, identification et activités biologiques des extraits aqueux et méthanolique des plantes	13
Figure 8 : Protocole expérimental	17
Figure 9 : Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive	21
Figure 10 : Schéma représentatif des 2 étapes de culture et de récolte des parasites	23
Figure 11 : Réaction de transformation de MTT en formazan par la succinate déshydrogénase	25
Figure 12 : Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes médicinales par classes d'âge dans la wilaya de M'Sila	27
Figure 13 : Répartition des informateurs selon le niveau d'instruction	28
Figure 14 : Répartition des espèces médicinales les plus utilisées dans la région de M'Sila	29
Figure 15 : Parties utilisées des plantes médicinales	32
Figure 16 : Modes d'utilisation des plantes médicinales	33
Figure 17 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	34
Figure 18 : Chromatogramme LC/MS de l'extrait aqueux du <i>Marrubium vulgare</i>	36
Figure 19 : Verbascosides et flavonoïdes de <i>Marrubium vulgare</i>	37
Figure 20 : Chromatogramme LC/MS de l'extrait méthanolique du <i>Marrubium vulgare</i>	39
Figure 21 : Chromatogramme LC/MS. Extrait aqueux d' <i>Artemisia herba alba</i>	40
Figure 22 : Chromatogramme LC/MS. Extrait méthanolique d' <i>Artemisia herba alba</i>	40
Figure 23 : Structure des composés identifiés dans l'extrait d' <i>Artemisia herba alba</i>	42
Figure 24 : Chromatogramme LC/MS de l'extrait aqueux d' <i>Ajuga iva</i>	43
Figure 25 : Chromatogramme LC/MS de l'extrait méthanolique d' <i>Ajuga iva</i>	44
Figure 26 : Structure des composés identifiés dans l'extrait d' <i>Ajuga iva</i>	46

INTRODUCTION

Introduction

Actuellement, l'usage de la médecine traditionnelle est très répandu et revêt une importance sanitaire et économique croissante. Dans les pays en voie de développement, l'usage de cette médecine est accessible et abordable particulièrement pour les patients les plus démunis, vu le coût élevé de certains médicaments ainsi que leur indisponibilité sur le marché.

Les plantes soignent, parfois très rapidement, non seulement la fatigue, l'insomnie, les maux de tête, la grippe, la toux, les rhumatismes, mais aussi de très nombreuses maladies chroniques parmi lesquelles on cite le diabète, la leishmaniose,... [1].

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution comme dans le cas du diabète.

En Algérie, le diabète, tous types confondus, touche 1,5 à 2 % de la population générale du pays. Le diabète de type 1 (qui atteint l'enfant et l'adolescent), représente 10 à 15 % de l'ensemble et a pour traitement l'insuline. Le diabète de type 2 (qui atteint l'adulte à partir de 35 ans) nécessite d'autres médicaments, un régime alimentaire et un suivi médical.

Les leishmanioses représentent un problème de santé majeur en santé publique. Bien que des médicaments existent pour traiter ces maladies, ceux-ci ne sont pas toujours efficaces. Du fait de l'apparition de parasites résistants et de la toxicité des produits. De plus, l'administration des traitements disponibles contre les leishmanioses s'effectue essentiellement par voie générale, ce qui nécessite une hospitalisation des patients. La recherche de nouvelles molécules thérapeutiques s'avère par conséquent nécessaire.

Une plante est dite médicinale lorsqu'au moins une partie d'elle possède des propriétés médicamenteuses, car elle renferme des principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies [2].

L'Algérie, de part sa position géographique, présente une large gamme d'étages bioclimatiques, induisant une biodiversité de plantes utilisées comme condiments, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques [3].

La pharmacopée Algérienne est qualifiée de traditionnelle parce que, à la différence des pharmacopées occidentales officialisées en formulaires ou codex, elle n'est pas écrite et s'est perpétuée jusqu'à présent de génération en génération, chez les guérisseurs et les herboristes uniquement par la transmission orale des connaissances et la pratique de l'art médical. Aujourd'hui, le savoir des tradipraticiens est de moins en moins transmis et tend à disparaître.

Une manière simple de conserver les cultures, les savoirs et les plantes qui y sont liées consiste à valoriser ces connaissances, les dynamiser, les expérimenter pour vérifier et valider leurs effets supposés et enfin leur donner un sens en intégrant la médecine traditionnelle dans le système de santé moderne.

Notre présente étude s'inscrit dans cet objectif et elle a porté sur :

- Une étude phytochimique qui a permis d'identifier certains groupes chimiques bioactifs contenus dans les extraits aqueux et méthanoliques des plantes étudiées : ***Marrubium vulgare*, *Ajuga iva* et *Artemisia herba alba*.**
- Evaluer l'activité antidiabétique in vivo, chez des rats avec un diabète induit ainsi que les activités antioxydante, antibactérienne et antileishmanienne in vitro, à doses déterminées des extraits des trois espèces végétales.

Cette étude sera subdivisée en deux parties :

- Une revue bibliographique où nous apportons des données générales sur les espèces étudiées.
- Une seconde partie dans laquelle nous rapportons les méthodes utilisées, les résultats obtenus ainsi que leur discussion et nous finirons par une conclusion.

***IDENTIFICATION BOTANIQUE
DES ESPECES VEGETALES
ETUDIEES***

1. Identification botanique des espèces végétales étudiées

1.1. *Ajuga iva* L.

Le genre *Ajuga* appartient à la famille des lamiacées avec plus de 300 espèces différentes. Cette plante est largement distribuée dans les régions arides d'Europe, d'Asie, d'Afrique et d'Australie [4].



Figure 1: *Ajuga iva*

1.1.1. Description botanique

Ajuga iva est une petite plante vivace de 5 à 20 cm de long, à tiges vertes rampantes et velues, à feuilles vertes de 14 à 25 mm de longueur, linéaires, denses et couvertes de duvets. Les fleurs sont violettes, roses, ou jaunes, de 20 mm de longueur ; la lèvre supérieure de la corolle est réduite ou absente et la lèvre inférieure est divisée en trois lobes velus. Les lobes latéraux sont petits, alors que le lobe central est relativement plus large décoré dans sa base par un axe central jaunâtre [5].

Systématique de la plante

Règne : *Plantae*

Ordre : *Lamiales*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Famille : *Lamiaceae*

Division: *Magnoliophyta*

Genre : *Ajuga*

Classe : *Magnoliopsida*

Espèce : *A. iva* L Schreb

Sous-classe : *Asteridae*

Nom binomial : *Ajuga iva* L Schreb

Nom vernaculaire algérien : Chendgora ; Français : Ivette

1.1.2. Composition chimique

La plante est riche en composés polyphénoliques, qui sont les meilleurs antioxydants, flavonoïdes et tanins [6]. Elle contient aussi des anthocyanes, des acides phénoliques et d'autres substances en particulier l'ajugarine [7].

Les études phytochimiques ont montrés que l'ivette contient aussi des ecdystéroïdes, des diterpénoïdes, des iridoïdes et des saponosides acides [8].

1.1.3. Utilisations de la plante

En médecine traditionnelle, *Ajuga iva* est utilisé pour traiter le diabète et l'hypertension [9], ainsi que les troubles gastro-intestinales et l'ulcère de l'estomac [10]. L'ivette est efficace contre la fièvre, la diarrhée, les gaz, les maux de tête et les maux de dents. En usage externe, elle est souvent employée en applications locales contre les rhumatismes, comme antiseptique et cicatrisante sur les plaies [11].

La richesse de l'ivette lui donne plusieurs propriétés prouvées scientifiquement. C'est un agent antioxydant [12], antidiabétique et hypolipidémique [13], vasodilatateur et donc anti hypertensif [14], antibactérien et antifongique [4].

1.2. *Artemisia herba alba* (Asso)

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des Astéracées (Composites), avec plus de 350 espèces différentes qui se trouvent principalement dans les zones arides et semi arides d'Europe, d'Amérique, d'Afrique du Nord et d'Asie. Les espèces d'*Artemisia* sont largement utilisées comme plantes médicinales en médecine traditionnelle [15].



Figure 2: *Artemisia herba alba*

I.2.1. Description botanique

L'armoise blanche est une plante des climats arides et semi-arides qui pousse dans les hautes plaines steppiques, les déserts du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord. C'est une plante herbacée à tiges ligneuses, ramifiées et tomenteuses de 30 à 50 cm de long. Les feuilles sont courtes, sessiles, pubescentes et argentées. Les capitules sont groupés en panicules de petite taille de 1,5 à 3 mm allongés et étroits contenant de 3 à 6 des fleurs jaunâtres. Les bractées externes de l'involucre sont orbiculaires et pubescentes [16].

Systematique de la plante

Règne : *Plantae*

Ordre : *Asterales*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Famille : *Asteraceae*

Division: *Magnoliophyta*

Genre : *Artemisia*

Classe : *Magnoliopsida*

Espèce : *A. herba alba* (Asso)

Sous-classe : *Asteridae*

Nom binomial : *Artemisia herba alba* (Asso)

Nom vernaculaire algérien : Chih ; **Français :** Armoise blanche

I.2.2. Composition chimique

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés et identifiés de l'*Artemisia herba alba* dont les plus importants sont les sesquiterpènes lactones tels que les eudesmanolides et les germacranolides [17]. Les flavonoïdes détectés dans l'armoise montrent aussi une diversité structurale allant des flavonoïdes communs (flavones glycosides et flavonols) jusqu'aux flavonoïdes méthylés qui sont très inhabituel. Les flavonoïdes glycosides comprennent les *O-glycosides* tels que quercitine-3-glucoside et des flavones *C-glycosides* qui sont rares dans le genre *Artemisia*, ainsi que dans l'ensemble des Astéracée [18,19].

En plus des sesquiterpènes lactones et des flavonoïdes l'analyse phytochimique a montré que la composition des huiles essentielles de l'*Artemisia herba alba* Asso est riche en monoterpènes, triterpènes pentacycliques, santonines, coumarines et tanins [20].

I.2.3. Utilisations de la plante

L'*Artemisia herba alba* est très utilisé en médecine traditionnelle lors d'un désordre gastrique tel que la diarrhée et les douleurs abdominales. Elle est aussi utilisée en tant que remède de l'inflammation du tractus gastro-intestinal [21].

Plusieurs études scientifiques ont également prouvées l'efficacité de l'armoise blanche en tant qu'agent antidiabétique [22], leshmanicide [23], antiparasitaire, antibactérien, antiviral, antioxydant, antimalarien, antipyrétique, antispasmodique et antihémorragique [24].

I.3. *Marrubium vulgare*

Le genre *Marrubium* appartient à la famille des lamiacées, comprenant plus de 30 espèces différentes largement distribués dans les régions d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie [25].



Figure 3: *Marrubium vulgare*

I.3.1. Description botanique

Le marrube est une plante herbacée, couverte d'un duvet blanc, à tiges dressées, portant souvent de nombreuses pousses courtes et stériles, de 40 à 60 cm de long. Les feuilles sont ovales, arrondies, souvent un peu cordées à la base, feutrées à la face intérieure. Il possède de petites fleurs blanches de 12 à 15 mm de long, une corolle à deux lèvres dont l'inférieure est trilobée et la supérieure dilobés ainsi qu'un calice à 10 dents courtes et crochues [16].

Systematique de la plante

Règne : <i>Plantae</i>	Ordre : <i>Lamiales</i>
Sous-règne : <i>Tracheobionta</i>	Famille : <i>Lamiaceae</i>
Division: <i>Magnoliophyta</i>	Genre : <i>Marrubium</i>
Classe : <i>Magnoliopsida</i>	Espèce: <i>M. vulgare</i>
Sous-classe : <i>Asteridae</i>	

Nom binomial : *Marrubium vulgare*

Nom vernaculaire algérien : Meriwet ; **Français :** Marrube blanc

I.3.2. Composition chimique

La partie aérienne du marrube blanc contient plusieurs métabolites secondaires tels que les diterpenes dont la marrubine responsable de la majorité des propriétés biologiques du *Marrubium vulgare* [26], les flavonoïdes (apigénine et lutéoline) [27], ainsi que plusieurs phenylpropanoïdes esters tels que les verbascosides [28].

I.3.3. Utilisations de la plante

Le marrube blanc est très utilisé en médecine traditionnelle comme expectorant, antispasmodique, antidiabétique, diurétique et en cas d'infections respiratoires. Il est aussi employé pour combattre la cellulite et l'obésité [29]. Plusieurs de ces utilisations traditionnelles ont été confirmés par des essais scientifiques [30] ; le marrube blanc est considéré comme antidiabétique [25].

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Présentation de la zone d'étude

1.1. Localisation géographique

La Wilaya de M'Sila se situe à 35°40' latitude Nord et 04°30' longitude Est, sur une altitude d'environ 500 m. Elle est située au Sud Est d'Alger, limitée au Nord par les Wilayates de Médéa, Bordj Bou-Arredj, Sétif et Bouira ; à l'Ouest par Djelfa ; à l'Est par Batna et au Sud par Djelfa et Biskra (**Figure 4**). Elle couvre près de 18.175 km². Du point de vue géographique, ce territoire ne présente aucune homogénéité [31].

1.2. Le sol

Le territoire de la wilaya constitue une zone charnière entre deux grandes chaînes de montagnes qui sont l'Atlas Saharien et l'Atlas Tellien ce qui lui donne une configuration géographique caractérisée par une zone

- de montagne de part et d'autre du chott El-Hodna,
- centrale constituée essentiellement de plaines et de hautes plaines,
- de Chott (Chott El-Hodna) au centre,
- de dunes de sables éoliens [32].

1.3. Climat de la région

Le climat de la région de M'Sila est caractérisé par un été sec très chaud et un hiver très froid avec une pluviométrie faible et irrégulière de l'ordre de 260 mm/an [32].

1.3.1. Les précipitations

Une précipitation moyenne annuelle de 260 mm contribue à la détermination du caractère aride de la région, qui est accentuée par l'extrême irrégularité de la répartition des pluies au cours de l'année. La nature orageuse des pluies constitue l'autre facteur explicatif de la sévérité du régime pluviométrique qui se traduit par une dominance du ruissellement. Les configurations topographiques des bas fonds permettent cependant la rétention d'une grande partie des eaux de pluies [33].

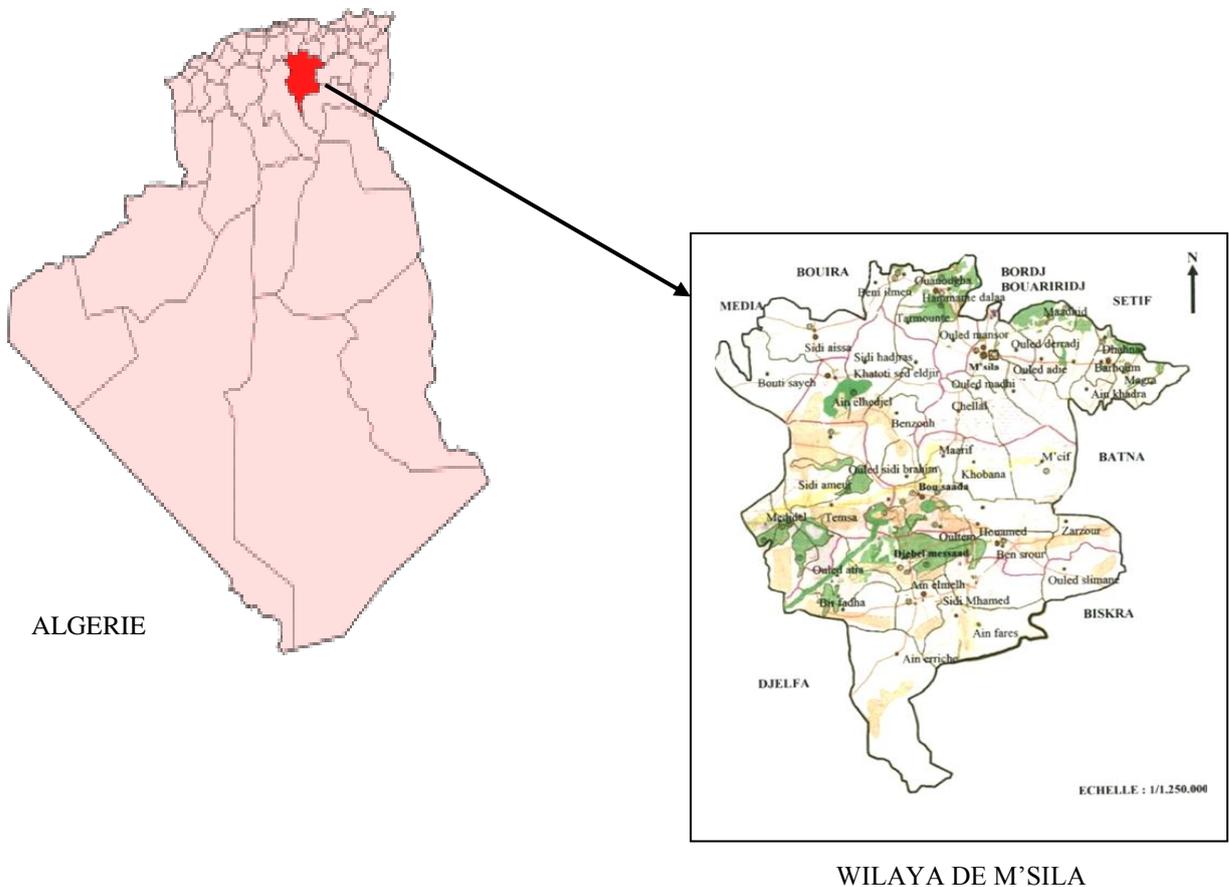


Figure 4: Localisation géographique de la zone d'étude [34].

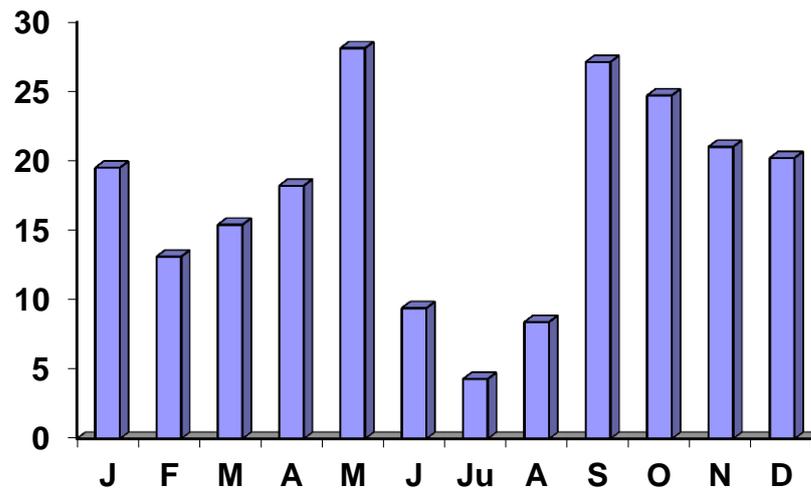


Figure 5: Histogramme des moyennes de précipitations mensuelles en mm [33].

1.3.2. Les températures

La température représente un facteur limitant de première importance car elle conditionne de ce fait la répartition de la totalité des espèces végétales [33]. Les températures moyennes minimales et maximales (1988-2007) sont consignées dans le **Tableau I**.

Tableau I : Répartition des moyennes de températures mensuelles en °C [33]

Station		Mois												Moy
		Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jui	Jut	Aou	Sep	Oct	Nov	Déc	
M'sila 1988- 2007	m	0.35	04.3	07.7	10.6	15.5	21	24.4	24.1	19.2	14.6	08.4	04.7	13.1
	M	13.9	16.1	20.2	22.9	27.9	34.7	38.5	38	32.2	25.7	18.9	14.2	25.2

m: moyennes mensuelles des températures minimales.

M: moyennes mensuelles des températures maximales.

1.3.3. Le couvert végétal

La grande partie de la Wilaya est couverte par la steppe (environ 63% du territoire) formée essentiellement d'Alfa et d'armoise. Au Nord, les parcours steppiques sont assez bien développés par contre au Sud, ils sont beaucoup plus dégradés. La flore à usage thérapeutique est relativement importante. Parmi les principales plantes figurent de nombreuses Lamiacées (qui sont largement utilisées dans la pharmacopée locale), Astéracées, Fabacées et Zygophyllacées [36].

2. Enquête ethnobotanique

La méthode d'étude est basée sur une fiche questionnaire ethnobotanique modifiée soumise aux enquêtés au cours d'entretiens individuels (**Fiche questionnaire**) [37].

Ce travail a duré plus de trois ans (2008/2009/2010) pendant lesquels nous avons réalisé des entretiens avec la plupart des herboristes des 48 communes de la Wilaya de M'Sila. Lors de chaque entretien nous avons collecté des informations sur l'enquêté et les plantes médicinales utilisées par celui-ci. Ainsi, le profil de chaque enquêté comprend le sexe, l'âge et le niveau d'étude.

Les données recueillies pour chaque plante comprennent le nom vernaculaire (nom commun), les usages, la partie utilisée et le mode de préparation. L'identification taxonomique des espèces a été réalisée ultérieurement à l'aide de la littérature [38,39] et par comparaison avec les échantillons de l'herbier du Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Faculté des Sciences, Université de M'Sila.

3. Etude phytochimique

3.1. Méthode d'extraction

Nous avons utilisé une méthode d'extraction en continue grâce à l'extracteur Soxhlet. 20 g de matériel végétal sont introduits dans une cartouche en cellulose fixée sur un ballon, et surmonté d'un réfrigérant. 400 ml de méthanol à 85 % sont vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair (après 6 heures).

Les extraits obtenus sont évaporés à sec à l'aide d'un rotavapor (Buchi R210). Ils sont ensuite solubilisés dans du méthanol pur et conserver à 4°C pour les tests d'activités biologiques (antioxydante, antileishmanienne et antimicrobienne). L'extrait aqueux est utilisé pour l'évaluation de l'activité antidiabétique (**Figure 6**).

FICHE QUESTIONNAIRE

Profil de l'informateur

Age 20 [20–30] [30–40] [40-50] 50-60] 60

Sexe Masculin Féminin

Niveau d'étude : Analphabète primaire Secondaire Universitaire

Les plantes médicinales utilisées par l'informateur

Noms vernaculaires	Maladies	Mode de préparation	Partie utilisée

Fiche questionnaire modifiée [37].

3.2. Analyses qualitatives et quantitatives des extraits de plantes

3.2.1. Dosage des phénols totaux

Le contenu total de polyphénols a été estimé selon la méthode colorimétrique basée sur le réactif de Folin Ciocalteu [40]. Le réactif est formé d'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3), ce qui nous aide à doser les phénols dans le visible à une longueur d'onde de l'ordre 765 nm.

Pour cela 100 μ l chaque extrait de plante a été mélangé à 200 μ l du réactif de Folin et 3.16 ml de H_2O . Le mélange est incubé à température ambiante pendant 3 minutes. Ensuite 600 μ l de la solution carbonate de sodium anhydre a 20% (poids/volume) sont ajoutés au mélange. Les polyphénols totaux sont déterminés après 2 h d'incubation à température ambiante par mesure de l'absorbance à 765 nm (Spectrophotometer UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan). La quantification est faite selon la courbe d'étalonnage standard de l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par ml d'extrait [41].

3.2.2. Analyse HPLC/UV-vis-DAD/ESI-MS et HPLC/UV-vis/DAD

Les analyses HPLC/UV-vis-DAD sont effectuées à l'aide d'un appareil Waters équipé d'une pompe de chromatographie liquide de haute pression 1525 binaires munis d'un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD) et d'un spectromètre de masse Quadrupol équipé d'une interface d'ionisation ESI en mode négatif (Micromass ZQ). Les analyses ont été réalisées en phase reverse avec une colonne C18 (5 μ m, 250 x 4.6 mm) (Alltech, Italie). La température a été maintenue à 25°C avec un four de fléau (Hitachi L-2300, Italie) et le volume d'injecteur choisi était 20 μ l. Les solvants utilisés sont de qualité HPLC et le débit est fixé à 1 ml/min. Les conditions chromatographiques consistent en un gradient ACN/HCOOH 2.5% avec le gradient suivant : 0 mn: 5% B; 10 mn: 15% B; 30 mn: 25 % B; 35 mn: 30% B; 50 mn: 90% B; ensuite laisser pendant 7 mn: 100% B.

Le détecteur UV à barrette diode (DAD) est réglé sur les signaux entre 190 nm et 800 nm en plaçant le détecteur à 330 nanomètres pour les acides cinnamiques et à 340 nanomètres pour les flavonoïdes. Des chromatogrammes d'ion total (TIC) ont été saisis en

mode négatif, utilisant une tension de cône de -20 V avec un balayage des masses entre 1500 et 1800 éléments de m/z.

Les autres paramètres utilisés pour la saisie des TIC étaient :

- Tension capillaire : 2.75 kilovolts
- Température de source: 150°C
- Température de dissolution: 280°C
- Écoulement de gaz (L/hr) : 400 (dissolution) et 210 (cône).

Les données rassemblées ont été traitées par un logiciel de masse Lynx (v. 4.00) (Waters Milan, Italie).

La quantification des métabolites des extraits aqueux et méthanoliques des trois plantes a été effectuée à l'aide d'un appareil Dionex P580 équipé d'une pompe à haute pression binaire, un détecteur d'alignement de la photodiode PDA-100, un compartiment de fléau de TCC-100 thermostatés et un injecteur ASI-100 automatisé témoin. Les données rassemblées ont été traitées par un système de gestion de l'information de chromatographie Chromeleon (v. 6.70). Des passages chromatographiques ont été exécutés en utilisant les mêmes conditions expérimentales précédemment décrites. La quantification a été effectuée à 330 nanomètres pour les dérivés d'acides chlorogéniques et de verbascoside utilisant des courbes d'étalonnage établies avec de l'acide chlorogénique et le verbascoside (coefficient de corrélation $R^2 = 0.9992$ et $R^2 = 0.9998$, respectivement). La même longueur d'onde a été employée pour quantifier l'apigénine et ses dérivés (apigénine en tant que norme externe, $R^2 = 0.9999$). La lutéoline et les métabolites relatifs ont été mesurés à 340 nanomètre utilisant la lutéoline elle-même pour accumuler la courbe d'étalonnage ($R^2 = 0.9999$). Les analyses ont été effectuées en triple.

4. Evaluation des activités biologiques

4.1. Activité antidiabétique

4.1.1. Matériel végétal et préparation des extraits

Les plantes ont été récoltées pendant la floraison en Mai 2009 dans la région de Hammam Dalaa, M'Sila. La partie aérienne de chaque plante a été lavée, séchée à température ambiante dans l'obscurité et ensuite finement broyée.

L'extrait aqueux a été préparé selon la méthode traditionnelle ; environ 6 g de la poudre de plante sont mis dans de l'eau bouillante.

L'infusé est laissé refroidir pendant 15 minute à température ambiante. Après filtration, le volume final est noté pour le calcul des différentes doses administrées. Il est utilisé tel qu'il est pour le test antidiabétique sur les animaux.

4.1.2. Les animaux

Des rats Wistar albinos mâles pesant entre 180 et 200 g ont été ramené de l'Institut de Pasteur d'Algérie (Centre d'élevage, Kouba, Alger). Ils ont été acclimatés aux conditions de l'animalerie pendant une semaine. Les animaux ont été alimentés ad libitum avec le régime de croquette (Office Nationale de l'Alimentation du Bétail, Bejaia) dont la composition est citée au **tableau II**, et de l'eau. Ils ont été gardés et maintenus dans les conditions de température et de lumière ambiante.

Tableau II : Composition du régime croquette (ONAB Bejaia)

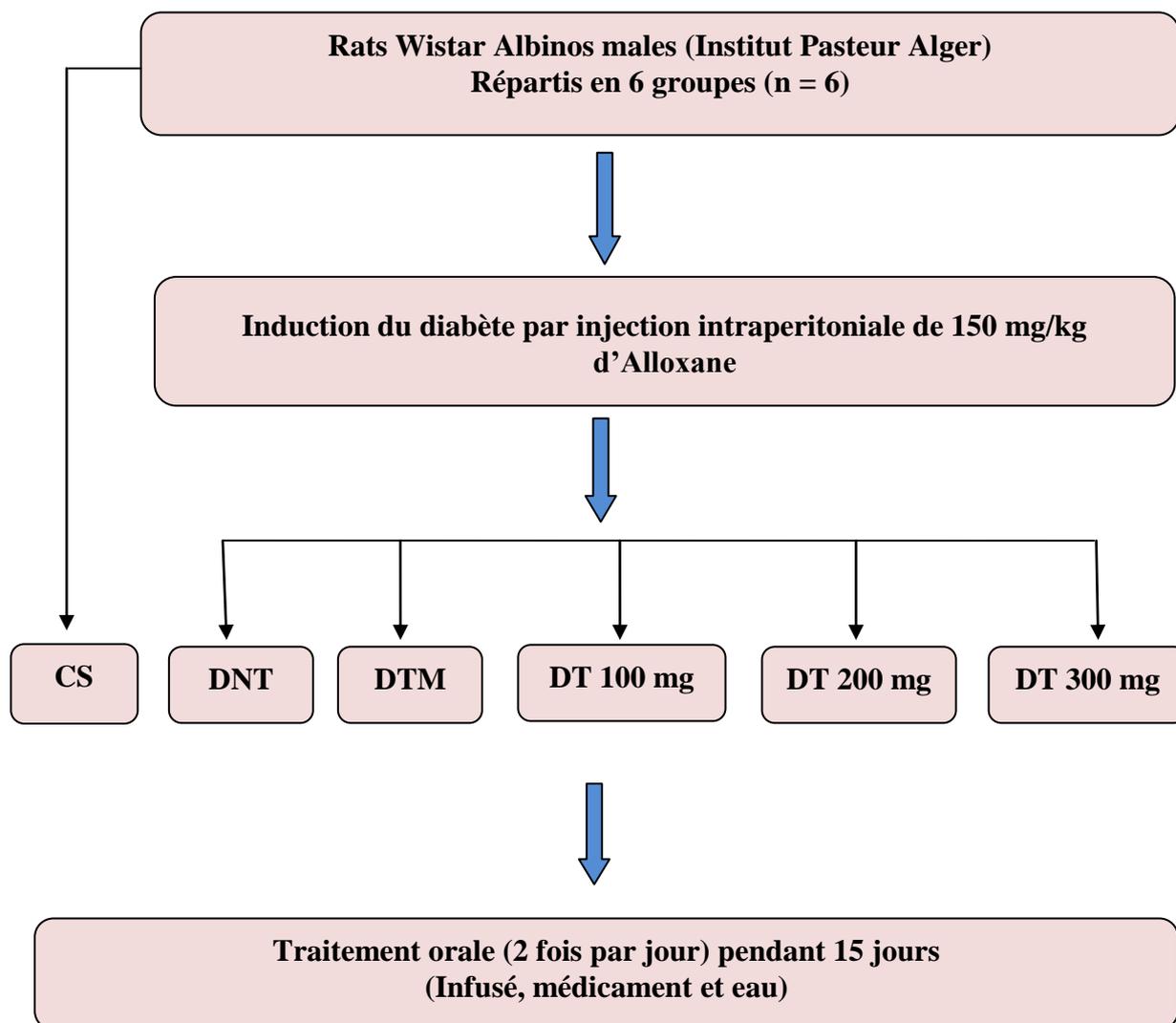
Composants	%
Mais	52.80
Son	10.80
Soja	32.10
Calcaire	01.50
Phosphate	00.80
Complément vitaminique	02.00

4.1.3. Induction du diabète

Les rats ont été injectés par voie intra péritonéale avec du monohydrate d'Alloxane (Sigma-Aldrich, USA) dissous dans l'eau saline stérile à une dose de 150 mg/kg de poids corporel [42]. Après 3 jours, l'hyperglycémie a été confirmée en utilisant un glucomètre Actif Accu-Chek (Roche Diagnostic, Allemagne). Seuls les rats avec des taux de glucose sanguin supérieur à 300 mg/dl ont été choisis et utilisés dans cette étude [43].

4.1.4. Protocole expérimental

Les rats ont été aléatoirement divisés en six groupes, chaque groupe est composé de six rats, selon la **figure 7**.



CS : contrôle sain ; **DNT** : Diabétiques non traités ; **DTM** : Diabétiques traités par 5 mg/kg de glibenclamide ; **DT 100 mg** : Diabétiques traités par 100 mg/kg p.c. de plante ; **DT 200 mg** : Diabétiques traités par 200 mg/kg p.c. de plante ; **DT 300 mg** : Diabétiques traités par 300 mg/kg p.c. de plante

Figure 7 : Protocole expérimental.

Les préparations (médicament, infusé et eau) sont données oralement aux rats des six groupes deux fois par jour pendant 15 jours.

4.1.5. Suivi des animaux avant sacrifice

- **Poids corporel**

Les rats ont été pesés chaque cinq jour grâce à une balance (KERN)

- **Glycémie**

Le sang a été prélevé de la queue du rat avant l'administration d'extraits pour la détermination du taux de glucose sanguin en utilisant un glucomètre Accu-Chek. Les résultats ont été exprimés en termes de milligramme par décilitre de sang. Le pourcentage de diminution de la glycémie est calculé de la manière suivante :

% de diminution de la glycémie = [(glycémie finale – glycémie initiale) / glycémie initiale] × 100.

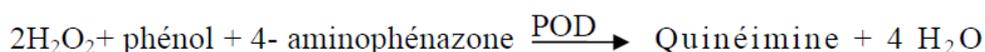
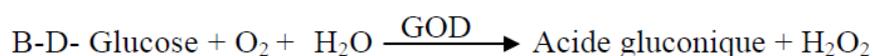
- (+) : indique une augmentation de la glycémie.
- (-) : indique une diminution de la glycémie.

4.1.6. Dosages biochimiques sanguin après sacrifice

A la fin des 15 jours du traitement, les rats sont sacrifiés le matin à jeun. Le sang est immédiatement recueilli dans des tubes pour le dosage des différents paramètres biochimiques. Le taux du glucose, cholestérol, triglycérides, lipides totaux, HDL, LDL, protéines totales, TGO, TGP, urée et créatinine ont été mesurés. Tous les paramètres ont été dosés selon la fiche technique Spinreact.

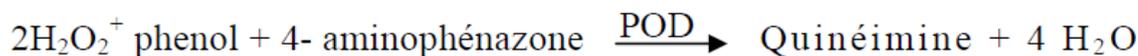
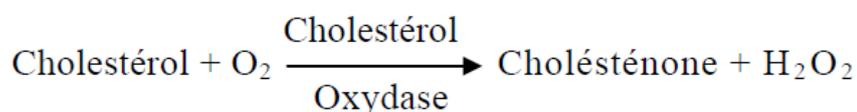
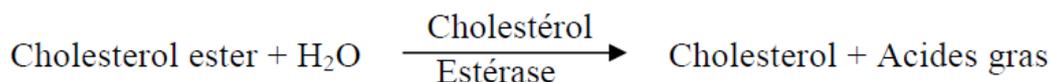
4.1.6.1. Dosage du glucose

Le glucose est mesuré après une oxydation enzymatique en présence du glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé réagit grâce à l'action catalytique d'une peroxydase, avec un phénol et la 4- amino-phénazone pour former un composé rouge violet de quinonéimine qui sert d'indicateur coloré, selon les réactions suivantes [44] :



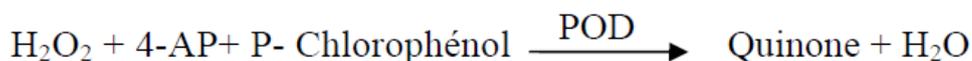
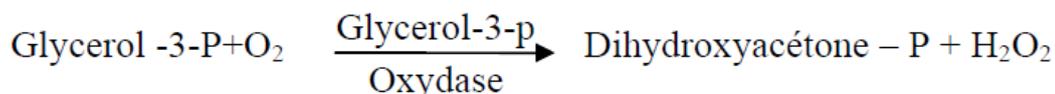
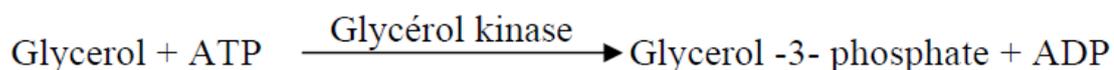
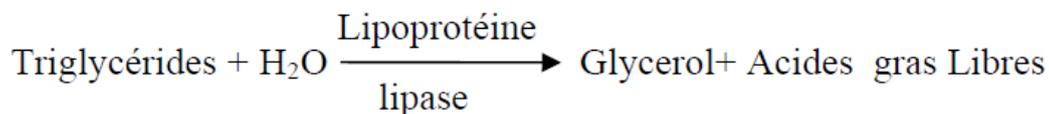
4.1.6.2. Dosage du cholestérol

Le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré selon les réactions suivantes [45] :



4.1.6.3. Dosage des triglycérides

Les triglycérides sont déterminés après une hydrolyse enzymatique par les lipases. L'indicateur est une quinone formée après les 4 réactions suivantes [45] :



4.1.6.4. Dosage des lipides totaux

Les lipides totaux forment avec le phosphovainilline et en présence de l'acide sulfurique un complexe coloré, l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration des lipides totaux dans les échantillons [45].

4.1.6.5. Dosage des HDL/LDL

La méthode est directe et sans prétraitement de l'échantillon. Au cours de la première phase, les particules LDL, VLDL et Chylomicrons libèrent du cholestérol libre qui, soumis à une réaction enzymatique, produit du peroxyde d'hydrogène, lequel est dégradé sous l'effet de la réaction avec la POD et le DSBmt. Aucun dérivé coloré n'est formé [46].

4.1.6.6. Dosage des protéines totales

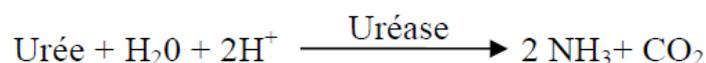
Les ions cuivriques dans un milieu alcalin, interagissent avec les liaisons peptidiques des protéines formant un complexe bleu violet où l'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité des protéines plasmatiques [47].

4.1.6.7. Dosage des transaminases TGO/ TGP

Les transaminases TGO et TGP présentes dans le sérum catalysent le transfert du groupement amine du glutamate vers l'oxaloacétate et le pyruvate dans des réactions réversibles. L'activité de ces enzymes est proportionnelle à la quantité du pyruvate où l'oxaloacétate formée après réaction avec 2, 4- Dinitrophénylhydrazine (DNPH) dans un milieu alcalin [48].

4.1.6.8. Dosage de l'urée

La technique utilisée pour la détermination du taux de l'urée est la méthode cinétique utilisant l'uréase selon les réactions suivantes [49].



La concentration de l'urée plasmatique est proportionnelle à la disparition du NADH^+ .

4.1.6.9. Dosage de la créatinine

La créatinine présente dans l'échantillon réagit avec le picrate en milieu alcalin pour donner un complexe dans des périodes initiales courtes en évitant ainsi l'interférence d'autre composé [50].

4.1.7. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne \pm écart type et les différences ont été considérées significatives à $P \leq 0,05$.

Ces calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB Version 13 d'analyse et de traitement statistique des données. Des comparaisons de groupe ont été exécutées par l'analyse de variance ANOVA. La différence significative entre le groupe contrôle et les groupes expérimentaux a été évaluée par le test t de Student.

4.2. Activité antioxydante

4.2.1. Test au DPPH

- Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (**Figure 8**) [51].

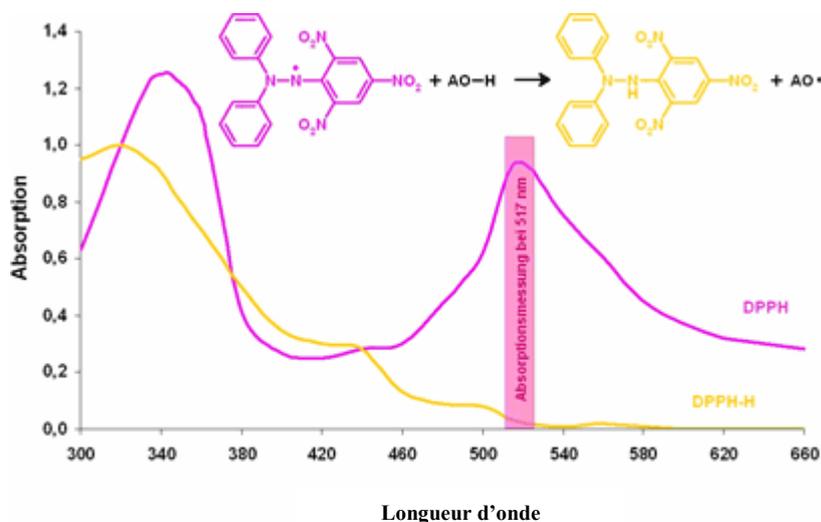


Figure 8: Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive [51].

Dans des tubes on introduit 2.5 ml de chaque extrait (0.1mg/ml) et 1ml de la solution méthanolique au DPPH (0.3 mM), après agitation au vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm (Spectrophotometer UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan) [52].

- **Expression des résultats**

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$\% = [1 - (\text{Abs échantillon} - \text{Abs contrôle négatif})] \times 100$$

% : pourcentage de l'activité anti-radicalaire

Abs Échantillon : absorbance de l'échantillon

Abs Contrôle négatif : absorbance du contrôle négatif

Le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique au DPPH et de 2,5 ml de méthanol [53].

Plusieurs concentrations ont été testées (2,5 mg/ml – 20 mg/ml) jusqu'à l'obtention de la concentration idéale de l'extrait. Les essais ont été effectués en triple.

4.3. Activité antileishmanienne

4.3.1. Milieux de culture

Ces milieux servent à l'isolement, au maintien et à l'enrichissement des souches. Parmi ces milieux on cite :

- Le milieu NNN (NOVY Mc NEAL et NICOLLE)
- Le milieu SLP (sérum de lapin coagulé)
- Le milieu CCS (Cœur Cerveau Sang de lapin)

Le milieu RPMI 1640 (milieu nutritionnel) bicarbonaté contenant L- glutamine (2 mM), 10% de sérum de veau fœtal inactivé, 100 UI/ml de pénicilline G et 50 µg/ml de streptomycine.

4.3.2. Culture des parasites

La mise en culture des parasites (*Leishmania infantum* MHOM/DZ/92/ lipa 137) (Institut Pasteur d'Alger) est faite selon les étapes de la **Figure 9** [54].

Avant chaque repiquage, un échantillon de la culture parasitaire doit être examiné sous microscope photonique à grossissement x 40 à fin de vérifier la richesse de la culture en promastigotes et s'assurer de l'absence de toute contamination des cultures par des germes ou des champignons.

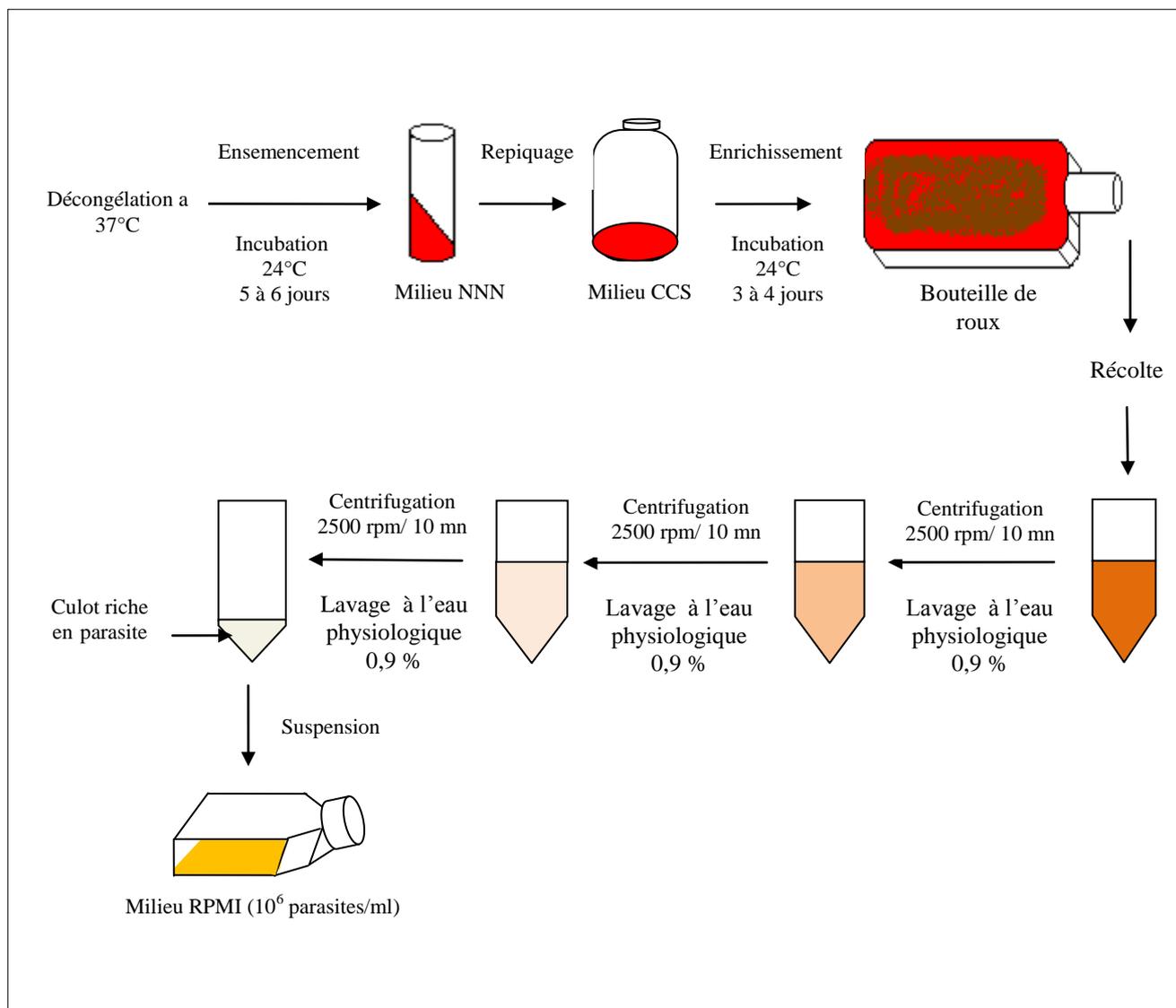


Figure 9: Schéma représentatif des 2 étapes de culture et de récolte des parasites.

4.3.3. Protocole du test de viabilité sur les promastigotes

- **Principe**

Des concentrations décroissantes de l'extrait à tester (de 100 à 10 $\mu\text{g/ml}$) sont solubilisées dans du DMSO pour analyse (Sigma-Aldrich), et disposées dans les puits d'une plaque 96 puits a fond plat. La concentration finale de DMSO par puits est inférieure

à 1 %. Les parasites sont ajoutés dans les puits à raison d'environ 2.10^5 par puits (100 μ l). Les plaques sont incubées 48 heures à 25°C [55].

La révélation se fait par l'ajout de 10 μ l de MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide, 98%, Sigma-Aldrich) à 10 mg/ml. La plaque est incubée pendant 4 heures. Le MTT (de couleur jaune) va être transformé par les déshydrogénases mitochondriales en sel de formazan (de couleur bleu) (**Figure 10**). La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 100 μ l d'isopropanol-20% sulfate Dodécyl de sodium.

La plaque est laissée à température ambiante pendant 30 minutes avec agitation. La lecture de l'absorbance à 570 nm permet d'évaluer l'activité des enzymes, responsable de la viabilité des parasites en comparaison par rapport à un:

- Blanc (milieu seul)
- Contrôle positif (le glucantime à 10 μ l)
- Contrôle négatif (milieu et parasites seuls)

La lecture se fait avec un spectrophotomètre lecteur de plaques 96 puits (Bio-Rad) [55].

La concentration d'inhibition des 50 % de la croissance des parasites, IC₅₀ (μ g/ml) est calculée après l'évaluation des pourcentages d'inhibition de croissance à différentes concentrations par le calcul de la tendance par logiciel Excel.

Tous les essais ont été répétés trois fois.

L'échelle de l'évaluation de l'activité est la suivante [56]:

- Très bonne activité pour une IC₅₀ < 10 μ g/ml
- Bonne activité pour une IC₅₀ comprise entre 10 et 25 μ g/ml
- Activité moyenne pour une IC₅₀ comprise entre 25 et 50 μ g/ml
- Activité faible pour une IC₅₀ > a 50 μ g/ml
- Activité nulle > 400 μ g/ml

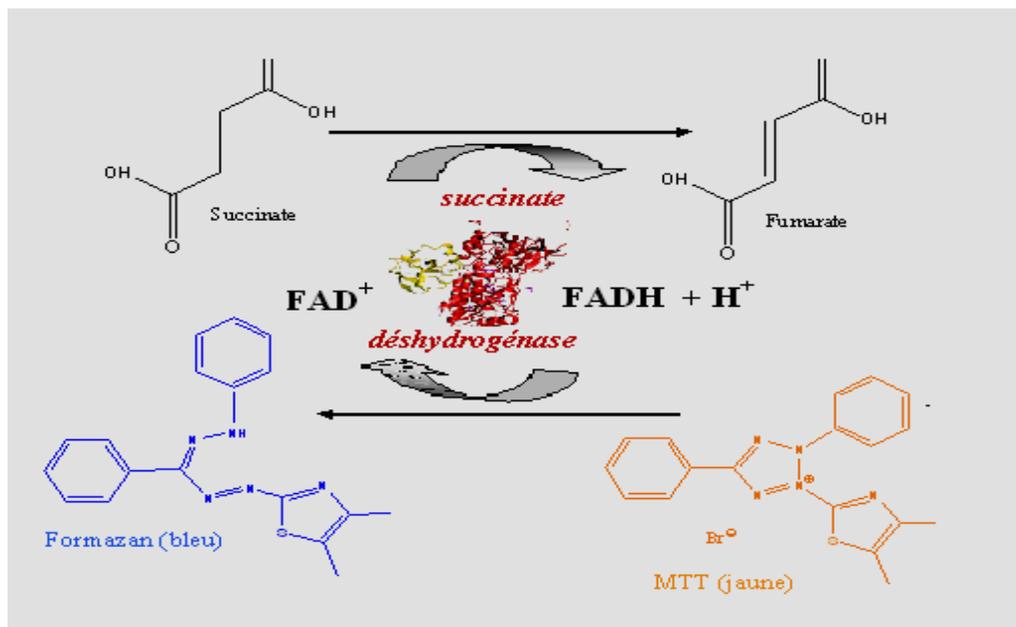


Figure 10: Réaction de transformation de MTT en formazan par la succinate déshydrogénase [57].

- **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition de croissance est déterminé par la relation :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \left(\frac{\text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs extrait}}{\text{Abs contrôle négatif}} \right) \times 100$$

4.4. Activité antibactérienne et antifongique

4.4.1. Microorganismes utilisés

Quatre souches microbiennes (03 bactéries et 01 levure) issues des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection) ont été utilisées: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Candida albicans* (ATCC 10231).

4.4.2. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque)

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes a une grande influence sur les résultats.

A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Dans cette étude, nous avons choisi la technique en milieu solide [58].

Après deux repiquages successifs sur bouillon (bouillon Muller Hinton pour les bactéries et Dextrose Sabouraud pour la levure) et un isolement sur milieu gélosé spécifique (gélose Muller Hinton et gélose Dextrose Sabouraud), des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité (exprimé par la mesure de la Densité Optique à 600 nm) voisine à celle de McFarland de 0.5. Une DO de 0.08-0.1 correspond à 10^8 UFC/ml [59]. Par la suite la surface entière de la gélose (Gélose Mueller Hinton pour les bactéries et Dextrose Sabouraud pour la levure) a été étalée par cette suspension microbienne.

Les extraits de plantes sont dissous dans du DMSO a raison de 100 mg/ml. Des disques stériles de 6 mm de diamètre (papier Whatman n°3) imprégnés de 10 μ l d'extrait de chaque plante par disque, ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 1 à 2 h ensuite incubées 24 h à 37°C pour les bactéries et 48 h à 37 °C pour la levure [59].

L'activité antimicrobienne a été déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Toutes les expériences ont été réalisées en triple.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS - DISCUSSIONS

1. Enquête ethnobotanique

1.1. Fréquence d'utilisation des plantes médicinales

L'information ethnobotanique rassemblée chez les herboristes, a été inscrite sur des fiches de données brutes puis transférée dans une base de données, traitée et analysée pour obtenir des données standardisées portant sur les aspects suivants :

- Fréquence d'utilisation des plantes médicinales dans la région
- Usages attribués à chaque espèce végétale
- Parties utilisées de chaque espèce végétale
- Modes de préparation les plus communément mentionnés

Le profil de la fréquence de vente des plantes médicinales a été fait selon :

- **Classes d'âge**

Le traitement des données nous a permis d'obtenir le graphique de la **figure 11**.

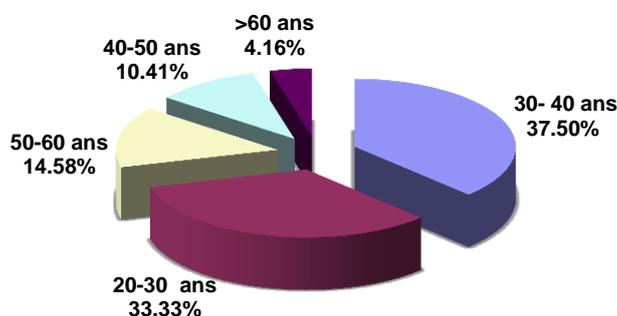


Figure 11. Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes médicinales par classes d'âge dans la wilaya de M'Sila.

Selon les résultats obtenus, nous avons constaté que les herboristes ayant un âge compris entre 20 et 40 ans constituent la tranche d'âge la plus importante parmi les herboristes de la région (environ 35%). Au cours des rencontres avec ces personnes, on a constaté qu'ils préparaient des mixtures de plantes pour des maladies chroniques tels que le diabète, parfois avec proposition d'arrêt du traitement médical, sans se soucier des complications de la maladie ni de l'effet de toxicité des plantes. Ces herboristes sont plutôt des vendeurs sans aucune connaissance des plantes. La classe d'âge comprise entre 50 et plus

de 60 ans représente une fréquence très basse, ente 5 et 15 %. Les résultats obtenus montrent que les personnes les plus âgées ont plus de connaissances en plantes médicinales par rapport aux autres classes d'âges.

L'expérience accumulée avec l'âge constitue la principale source d'information à l'échelle locale. Les personnes de cette tranche d'âge ont une meilleure détention de l'information sur les plantes médicinales (utilisation, récolte, séchage, conservation et utilisations) ainsi que les maladies.

- **Sexe**

Dans cette région, les hommes et les femmes sont concernés par la médecine traditionnelle. Cependant, les hommes ont plus de connaissances sur les plantes médicinales par rapport aux femmes cela est du aux traditions culturelles de la région du Hodna qui n'est pas favorable aux femmes commerçantes.

- **Niveau de scolarisation**

La grande majorité des herboristes ont un niveau d'étude secondaire, avec un pourcentage de 50 % (**Figure 12**). Ce pourcentage relativement élevé est en corrélation directe avec le niveau d'études de la population locale utilisatrice des plantes. Néanmoins, les herboristes analphabètes ont un pourcentage de 25 % ce qui est non négligeable.

A la fin du traitement des questionnaires, on a constaté que 60 % de ces personnes de niveau secondaire et analphabète sont de la tranche d'âge 20 – 40 ans ce qui pose réellement un problème d'utilisation des plantes et les autorités doivent intervenir pour régler la vente des plantes médicinales puisqu'elles ne sont pas dépourvues de toxicité.

Les herboristes universitaires rencontrés représentent 15% en se dénommant « tradipraticiens », en majorité des femmes.

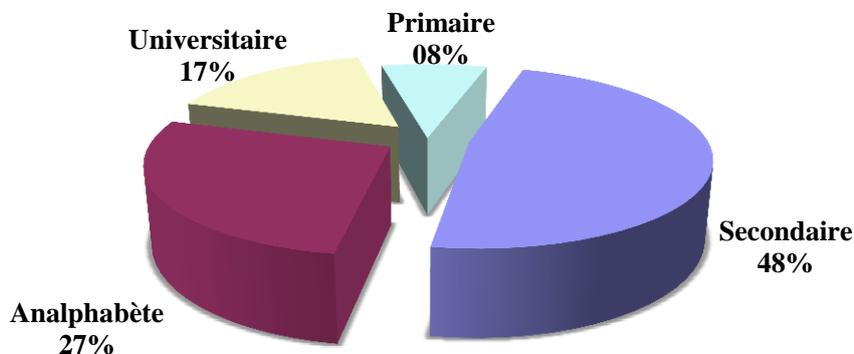


Figure 12: Répartition des informateurs selon le niveau d'instruction

1.2. Fréquence d'utilisation des plantes médicinales

Lors des enquêtes auprès des herboristes, les plantes mentionnées dans le questionnaire étaient soit des plantes locales et spontanées, soit des plantes cultivées ou importées. En totalité, 103 espèces médicinales vendues par les herboristes des 48 communes de la wilaya de M'Sila sont des espèces locales et spontanées ou cultivées.

Cette forte utilisation des espèces locales peut s'expliquer par le prix élevé des plantes médicinales importées, par la gratuité et la proximité des plantes médicinales. La **figure 13** montre les plantes les plus vendues par les herboristes pour traiter plusieurs maladies.

Selon les vendeurs les espèces les plus utilisées par la population locale sont : *Artemisia herba alba*, *Marrubium vulgare*, *Ajuga iva*, *Rosmarinus officinalis* et *Juniperus phoenica*.

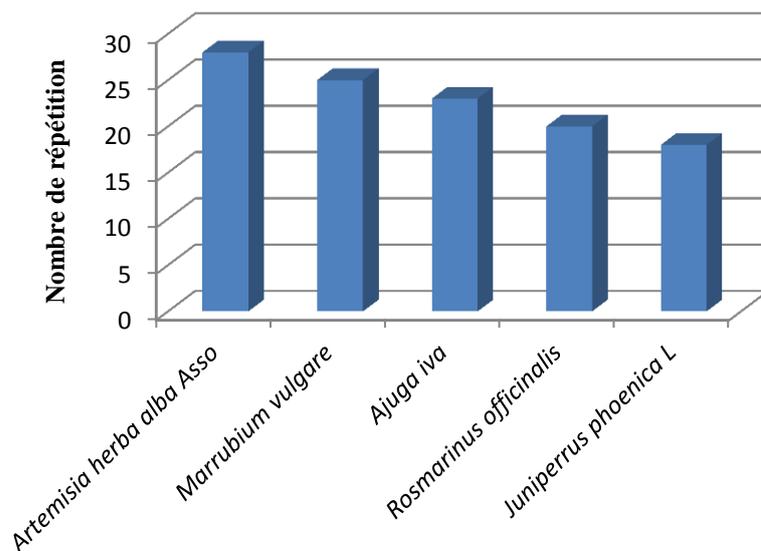


Figure 13: Répartition des espèces médicinales les plus utilisées dans la région de M'Sila

Lors du traitement des enquêtes ethnobotaniques, on s'est intéressé seulement aux plantes médicinales spontanées de la région. Au total 58 plantes spontanées figurent dans le **Tableau III**. Ce tableau cite la famille des espèces végétales, le nom commun, le nom scientifique, les utilisations, le mode d'utilisation et la partie de la plante utilisée.

Tableau III : Plantes médicinales spontanées inventoriées auprès des herboristes (W. de M'Sila)

Famille	Nom vernaculaire	Nom scientifique	Utilisations	Parties utilisées	Mode d'utilisation
Lamiaceae	Chendgora	<i>Ajuga iva schreb</i>	antidiabétique, hypotenseur leishmanicide problèmes digestives, antitumoral	aérienne	infusion décoction poudre
	Merriout	<i>Marrubium vulgare</i>	antidiabétique, leishmanicide Antitumoral, problèmes digestives	aérienne	infusion poudre
	Merriout sahraoui	<i>Marrubium deserti</i>	leishmanicide antidiabétique problèmes digestives	feuilles	infusion macération poudre
	Meriouet	<i>Marrubium supinum L.</i>	hypotenseur	aérienne	infusion
	Meriout	<i>Ballota hirsuta</i>	problèmes digestives	aérienne	décoction
	Ikil eljabel	<i>Rosmarinus officinalis</i>	hypotenseur tonique	aérienne	infusion décoction
	Khayata	<i>Teucrium polium L.</i>	antidiabétique hypotenseur	aérienne	décoction poudre
	Feliou	<i>Mentha pulegium L.</i>	hypotenseur antispasmodique	aérienne	infusion
	Meguene	<i>Mentha rotundifolia</i>	rhumatisme	aérienne	infusion compresses
	Zaàter	<i>Origanum glandulosum</i>	hypotenseur problèmes digestives	aérienne	décoction
	Om lem – -dhamedh	<i>Salvia verbenaca</i>	Cicatrisant, carminatif, tonique	aérienne	décoction poudre
	Siwak elnabi	<i>Salvia officinalis</i>	Antidiabétique, hypotenseur amaigrissant	aérienne	décoction
Djertil	<i>Thymus ciliatus</i>	Antidiabétique, hypotenseur hypocholestérolémiant	aérienne	décoction	
Astéraceae	Babounje	<i>Anthemis nobilis</i>	rhumatisme sédatif	sommités fleuries	infusion compresse
	Chih	<i>Artemisia herba alba</i> Asso	Antidiabétique, antitumoral leishmanicide, antispasmodique	aérienne	infusion décoction
	Tegofte	<i>Artemisia campestris</i>	antidiabétique hypotenseur	aérienne	décoction
	Chajrat meriem	<i>Artemisia absinthium</i>	antidiabétique analgésique	aérienne	Infusion
	Telma	<i>Taraxacum laevigatum</i>	sudorifique diurétique	aérienne	infusion fraiche
	Hendebe	<i>Taraxacum officinalis</i>	antidiabétique tonique	aérienne	infusion décoction
	Jaàda	<i>Santolina rosmarinifolia</i>	cicatrisant problèmes digestives	aérienne	infusion décoction poudre
	Ekhelia	<i>Achella millefolium</i>	tonique	sommités fleuries	Infusion
	Morart lehnach	<i>Erythraea centaurium</i>	antipyrétique problèmes digestives	sommités fleuries	décoction
	Negoud	<i>Palinis spinosa</i>	antidiabétique	aérienne	infusion décoction
Opiaceae	Chebth	<i>Anethum graveolens</i>	diurétique hépatique	aérienne	infusion
	Kozah	<i>Pituranthos scoparius</i>	problèmes digestives	aérienne	décoction
	Bounafaà	<i>Thapsia garganica</i>	rhumatisme	aérienne racine	compresse

RESULTATS ET DISCUSSIONS

	Kelekha	<i>Ferula communis</i>	amaigrissant	aérienne	décoction
Fabaceae	Retam	<i>Retama retam Webb</i>	vermifuge	aérienne	décoction
Globulariaceae	Tesslegha	<i>Globularia alypum L.</i>	Antidiabétique, leishmanicide problèmes digestives	sommités fleuries	infusion décoction
Chénopodiaceae	Selg	<i>Spinacia oleracea</i>	antidiabétique rhumatisme	feuilles	infusion compresse
	Gtaf	<i>Atriplex halimus</i>	eczéma	aérienne	infusion lotion
Gramineae	Helfa	<i>Stipa tenacissem</i>	antidiabétique amaigrissant	aérienne	décoction poudre
Typhaceae	Bardi	<i>Thypha angustifolia</i>	cicatrisant	graines	décoction
Composeae	Rkiza	<i>Chrysanthemum broncium</i>	problèmes digestives	fleurs	infusion
	Ladad	<i>Atractylis gummifera</i>	antispasmodique	racine	infusion
Caryophyllaceae	fatet lehdjar	<i>Paronychia argentea</i>	antilithiasique	aérienne	infusion décoction
Oléaceae	Zitoune	<i>Olea europaea</i>	antidiabétique hypotenseur	feuilles	décoction
Cupressaceae	Aaràar	<i>Juniperus phoenicea L.</i>	problèmes digestives rhumatisme	aérienne	infusion décoction compresse
	Taga	<i>Juniperus oxycedrus</i>	rhumatisme	aérienne	compresse
Myrtaceae	Kalitouss	<i>Eucalyptus globulus L.</i>	antigrippe antitussif	feuilles	infusion fumigation
	Rihane	<i>Myrtus communis</i>	hypotenseur	aérienne	infusion décoction
Urticaceae	Horeig	<i>Urtica dioica</i>	Antidiabétique, rhumatisme	sommités fleuries	décoction compresse
Cucurbitaceae	Haj (handhal)	<i>Citrillus colocynthis</i>	hypotenseur antitumoral	aérienne	décoction pommade
	Fegous lehmir	<i>Ecballium elaterium</i>	hépatique	fruit	insufflation
Equisétaceae	Dhaneb elkheil	<i>Equisetum arvense</i>	Antitumorale, hépatique	aérienne	décoction
Rhamnaceae	Sedra	<i>Zizyphus lotus</i>	rhumatisme cicatrisant	feuilles	infusion décoction poudre
	Melisse	<i>Rhamnus alaternus</i>	hépatique	aérienne	décoction
Aristolochaeae	Ben rostom	<i>Aristolochia rotunda</i>	antitumorale	racine	poudre
Thymelaceae	Methnane	<i>Thymelaea hirsuta</i>	leishmanicide vermifuge	aérienne	infusion compresse
	Lazaz	<i>Daphne gnidium L.</i>	rhumatisme	aérienne	compresse
Rutaceae	Fijel	<i>Ruta chalepensis</i>	hypotenseur antispasmodique	aérienne	infusion poudre
Poaceae	Diss	<i>Ampelodesma mamitanicum</i>	antidiabétique hypotenseur	aérienne	décoction
Plantaginaceae	Lessan elhamel	<i>Plantago lanceolata</i>	cicatrisant conjonctivite	aérienne	infusion compresse
Borraginaceae	Lessan elthor	<i>Anchusa azurea Mill</i>	antitumoral rhumatisme	aérienne	infusion
Apocynaceae	Defla	<i>Neurium oleander</i>	antitumoral leishmanicide	fleure	infusion poudre
Zygophyllaceae	Harmel	<i>Peganum harmala</i>	antidiabétique	aérienne graine	infusion décoction poudre
Tamaricaceae	Tarfa	<i>Tamarix africana</i>	problèmes digestives	aérienne	décoction
Malvaceae	Khobeiz	<i>Malva sylvestris</i>	rhumatisme amaigrissant	aérienne	décoction

1.2.1. Domaines d'indication thérapeutique

L'enquête ethnobotanique a révélé que les espèces médicinales spontanées sont utilisées contre plusieurs pathologies dont les plus importantes sont citées dans le **Tableau IV**.

Tableau IV : Domaine d'indication thérapeutique

Pathologies	Nombre de citation
Troubles digestives	11
Diabète	18
Inflammation	11
Hypertension	14
Tumeur	08
Leishmaniose	06
Obésité	03

1.2.2. Parties utilisées

Dans la zone d'étude, la partie aérienne des plantes est la plus utilisée avec un pourcentage de 50 %, viennent ensuite les feuilles (30 %), les fruits (11%) et les racines (5 %) (**Figure 14**). Nous avons remarqué que sur le terrain les utilisateurs ont tendance à arracher la plante entière au lieu de s'intéresser uniquement à la partie concernée. Sachant qu'il existe une relation manifeste entre la partie utilisée de la plante exploitée et les effets de cette exploitation sur son existence [60]. Ce mode de cueillette compromet sérieusement la durabilité des espèces médicinales de la région.

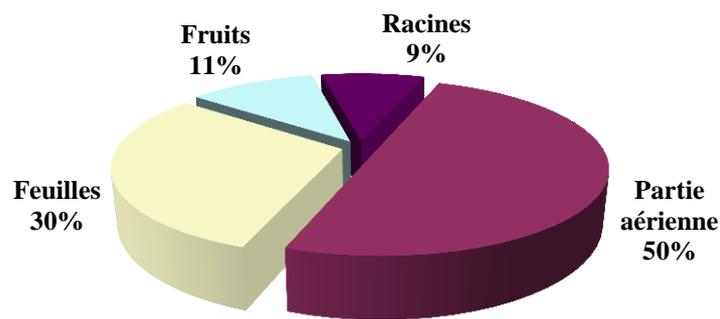


Figure 14: Parties utilisées des plantes médicinales

1.2.3. Mode de préparation

L'infusion et la décoction constituent le mode de préparation le plus fréquent (43 % et 27 % respectivement). D'autres modes d'utilisations sont regroupés sous le terme d'usage externe (19 %), il enveloppe les compresses, les cataplasmes, la fumigation, bain de siège,..... La poudre est un mode d'utilisation non négligeable (11 %). (**Figure 15**).

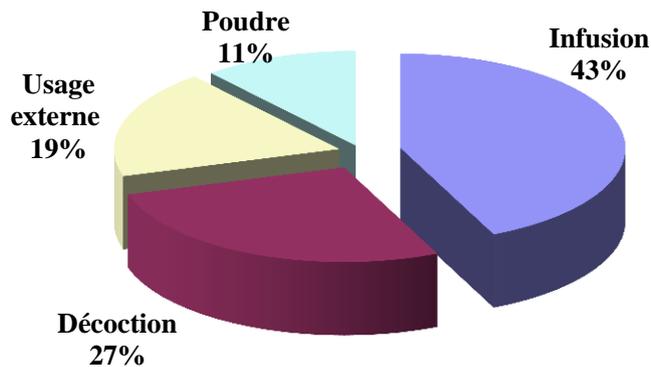


Figure 15 : Modes d'utilisation des plantes médicinales

Le choix des plantes de notre étude s'est fait selon le résultat du traitement de l'enquête ethnobotanique qui a indiqué les plantes médicinales les plus utilisées par les herboristes dans le traitement de plusieurs pathologies (diabète, leishmaniose,...). Parmi ces plantes on a l'*Ajuga iva*, l'*Artemisia herba alba* et le *Marrubium vulgare*.

2. Etude phytochimique

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes [61], et comme la majorité de leurs effets pharmacologiques est due à ces substances ; un dosage des polyphénols totaux des trois extraits méthanoliques a été effectué sachant que le méthanol a été recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques [62].

2.1. Taux des phénols totaux

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait méthanolique a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 16**) et exprimé en milligramme par millilitre d'extrait équivalent en acide gallique (mg EAG/ ml E). Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau V**.

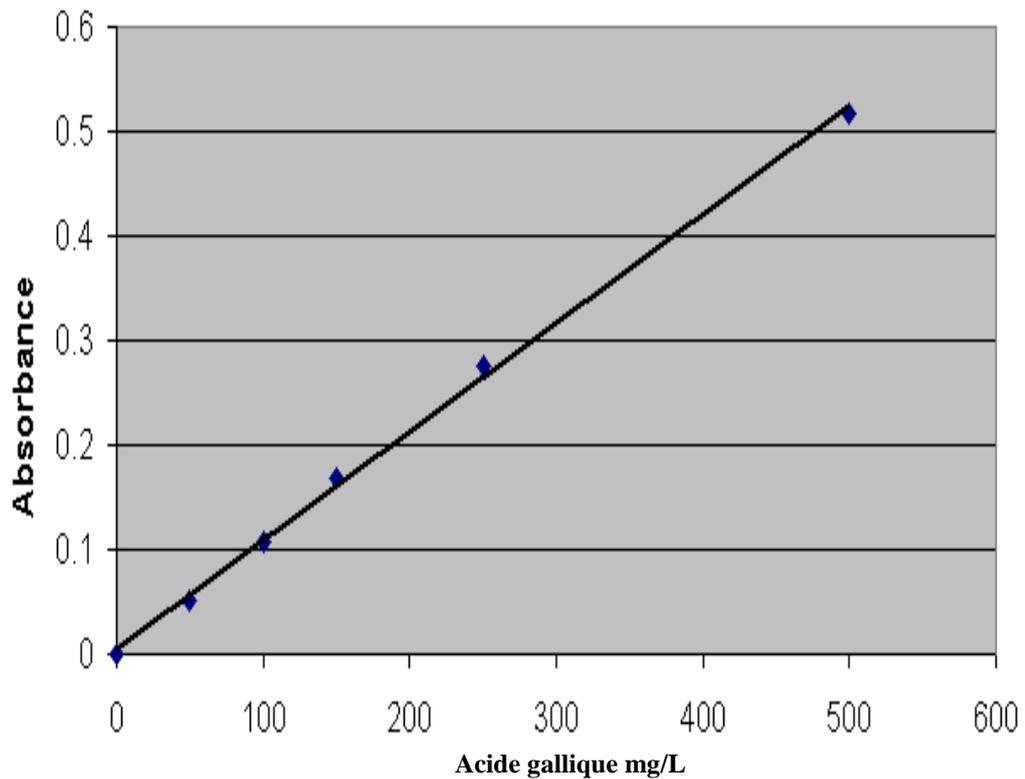


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Tableau V : Teneur en phénols totaux des différents extraits méthanoliques

Extraits	Teneur en polyphénols (mg EAG/ml E)
<i>Artemisia herba alba</i>	25.34 ± 0.69
<i>Ajuga iva</i>	06.30 ± 0.29
<i>Marrubium vulgare</i>	18.21 ± 0.20

D'après ces résultats l'extrait méthanolique de l'*Artemisia herba alba* est le plus riche en polyphénols (25.34 ± 0.69 mg EAG / ml E) suivi par l'extrait du *Marrubium vulgare* (18.21 ± 0.20 mg EAG/ml E) et enfin celui de l'*Ajuga iva* qui contient une faible quantité de polyphénols par rapport aux deux autres extraits (06.30 ± 0.29 mg EAG / ml E).

L'extrait méthanolique du *Marrubium vulgare* contient une teneur en polyphénols plus faible comparé aux résultats obtenus par d'autres études [63], ceci est peut être lié au climat de la région ou à la méthode utilisée qui ne donne pas une composition quantitative complète des extraits [64].

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait d'*Artemisia herba alba* obtenue lors de cette étude est comparable à celle obtenue par d'autres auteurs [65].

L'utilisation combinée de la chromatographie en phase liquide (LC) couplée avec l'UV-Visible et le détecteur à barrettes diode ainsi que la spectrométrie de masse (MS) et l'ionisation à pulvérisation électronique (ESI) est à ce jour un outil puissant qui permet l'acquisition d'importantes données analytiques, à savoir les spectres UV-vis et les masse pour obtenir des indications fondamentales sur la nature chimique des composants des extraits de plantes étudiées.

2.2. Analyses qualitatives et quantitatives des extraits aqueux et méthanoliques.

2.2.1. Extrait aqueux et méthanolique du *Marrubium vulgare*

Une série d'injections préliminaires avec un mélange des étalons analytiques nous a permis d'établir les paramètres expérimentaux d'ESI-MS. Des dérivés complexes d'acides cinnamiques tels que les verbascosides (également connu sous le nom d'actéosides) ainsi que les dérivés de lutéoline et d'apigénine, peuvent plus facilement être détectés par réglage de la sonde ESI en mode négatif.

Le chromatogramme de LC (**Figure 17**) d'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* peut être divisée en deux parties différentes : la première, de 20,00 à 26,50 minutes où le verbascoside et ses dérivés complexes de sucre s'éluent, tandis que les flavonoïdes glycosylés apparaissent dans l'intervalle entre 26,51 et 42,50 min.

Les données provenant des analyses spectrométriques de masse (valeurs de masse de d'ion pseudomoléculaire et principaux fragments) étaient cruciales pour essayer d'identifier les pics 4-9 de la **figure 17** comme dérivés de verbascosides ; en fait, à partir des valeurs m/z des ions négatifs pseudomoléculaires correspondants, nous pouvions adresser une masse moléculaire de 888 au pic 4, 756 au pic 5, 6 et 7, et une masse moléculaire de 770 , pic 9.

L'identité du pic 8 comme verbascosides a été confirmé par la co-injection avec l'étalon original, qui était également utile pour comparer les modèles de fragmentation le long de cette série. Selon les données présentes dans la littérature les pics 4 et 9 peuvent être identifiés comme ballotetroside et alyssonoside, respectivement (**Tableau VI**).

Marrubium vulgare

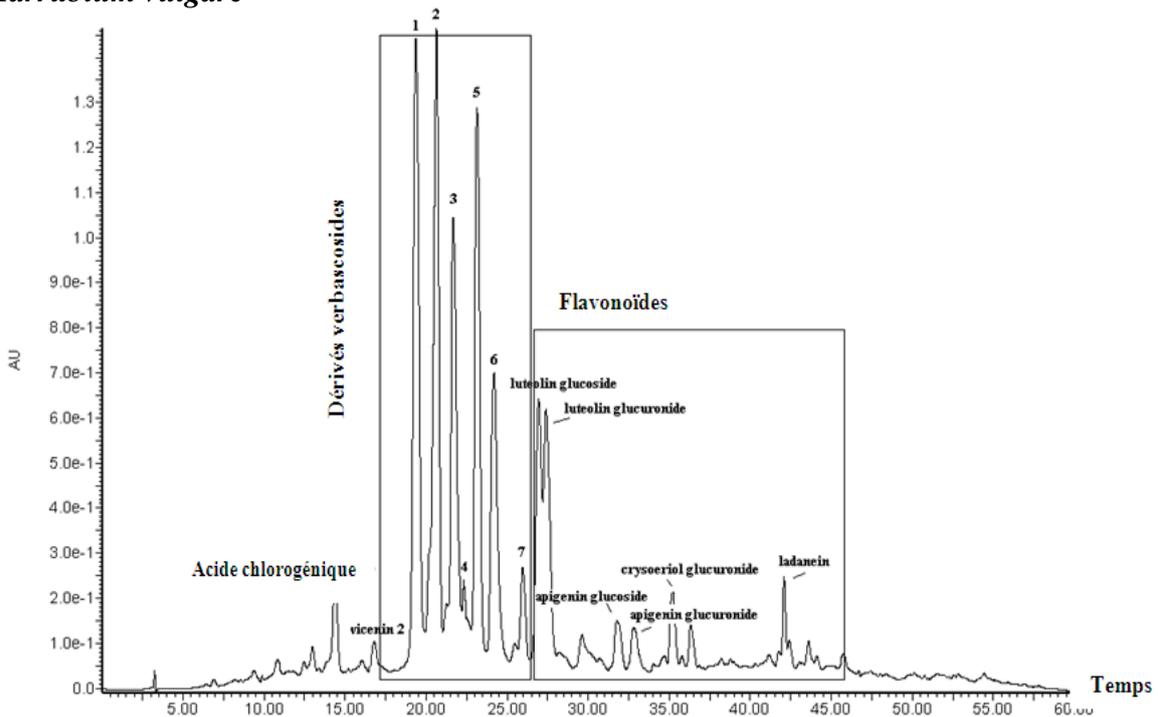


Figure 17 : Chromatogramme LC/MS de l'extrait aqueux du *Marrubium vulgare* à 330 nm.

Les trois pics (5-7), avec la masse moléculaire de 756, correspondent au moins à quatre métabolites isomériques différents à savoir, angaroside, arénarioside, forsythoside B et lanvandulylfoliside, tous trouvés dans les espèces de *Marrubium* et/ou dans son genre étroitement lié *Ballota* [66,67]; malgré les données MS, on n'a pas pu identifier avec précision chaque isomère.

Ces composants, qui peuvent être considérés plus spécifiquement comme étant des glycosides de phényléthanoïde, sont caractérisés par des groupements acides, éthyle phényle, caféoyle, féruloyl et acétyle, et des séries de fractions d'isomères de sucre (**Figure 17**). Cette complexité moléculaire implique intrinsèquement un grand nombre d'isomères, encore compliquée par la présence des différents dérivés mono- et poly-méthoxy [68,69].

La **figure 18** montre quelques structures choisies des molécules mentionnées sur la **figure 17**.

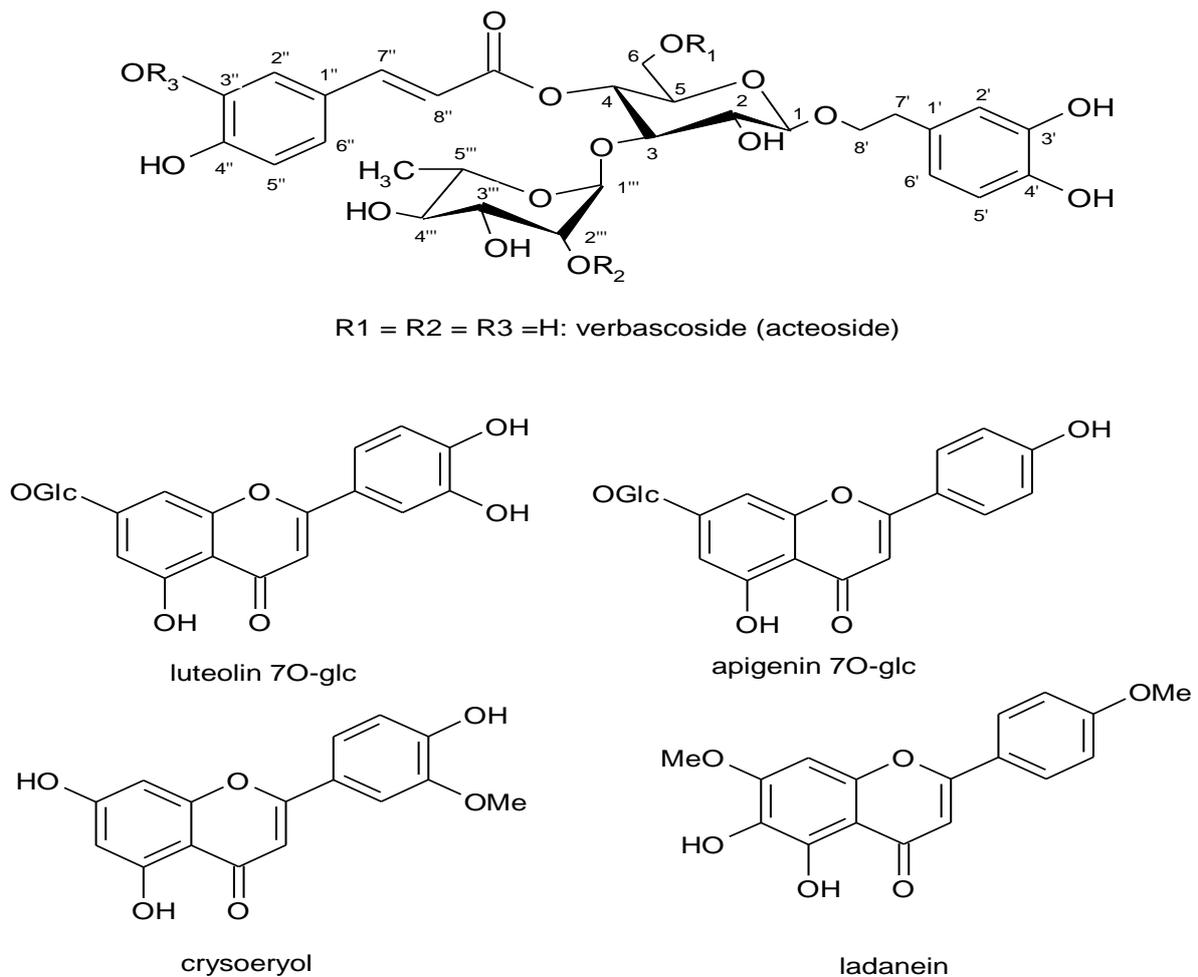


Figure 18 : Verbascosides et flavonoïdes du *Marrubium vulgare*.

Tableau VI: Liste des métabolites identifiés dans l'extrait aqueux du *M. vulgare*

Pics	Rt (min)	Identification	mg/100m g matière sèche
1	14,74	acide 5- <i>O</i> -caffeoilquinique (chlrogénique)	0,67
2	17,21	apigénine 6,8 di- <i>C</i> -glucoside (vicénine-2)	0,42
3	20,05	pic 1 ^a	1,88
4	21,17	pic 2 (verbascoside-pentoside-pentoside: ballotetroside) ^{b,c}	3,66
5	22,28	pic3 (verbascoside-pentoside) ^b	2,22
6	23,02	pic 4 (verbascoside-pentoside) ^b	0,45
7	23,58	pic 5 (verbascoside-pentoside) ^b	2,76
8	24,79	verbascoside ^d	1,78
9	26,37	pic 7 (verbascoside-pentoside-CH ₃ : alyssonoside) ^{b,c}	0,67
10	27,04	luteoline <i>O</i> -glucoside	1,21
11	27,82	luteoline <i>O</i> -glucuronide	1,02
12	31,69	apigénine <i>O</i> -glucoside	0,62
13	33,08	apigénine <i>O</i> -glucuronide	0,65
14	35,37	chrysoeriol glucuronide	0,69
15	41,89	Ladaneine	0,47
Flavonoïdes totaux			5,08
Acide cinnamique et dérivés (verbascosides)			14,09 (13,42)

^a N.I. : dérivé verbascoside non identifié ; ^b provisoirement identifié ; ^c isomère non identifié, ^d co-injection avec standards de haute pureté.

Enfin, le pic 3, sur la base de ces données spectrales de masse (ion pseudomoléculaire et fragmentations principales), est probablement un autre dérivé de verbascosides. D'autres investigations analytiques par le biais de méthodes spectroscopiques exhaustives sont exigées pour une identification non ambiguë.

Dans la deuxième moitié du chromatogramme, s'étendant de 26,51 à 42,50 min, sept pics principaux s'éluent, leurs UV-vis et spectres de masse sont attribuables à plusieurs dérivés de la lutéoline de flavonoïde et apigénine. En fait, l'apigénine est présente sous forme glucoside et glucuronide (pic 12 et 13), le chrysoeriol (3'-méthoxyapigénine) et la ladanéine (6-diméthyléther-7,4-hydroxyapigénine, pic 15) peuvent être considérés comme des dérivés

d'apigénine, le vicénine 2 (apigénine 6.8 di C-glucoside, pic 2), au temps de rétention 16,50 mn (**Figure 17** et **Tableau VI**).

Le chrysoéryol et la ladanéine de flavonoïdes, ainsi que les dérivés de verbascosides mentionnés ci-dessus, appartiennent au groupe de marqueurs chimiotaxonomiques pour cette plante. Quantitativement, le groupe d'ester de phénylpropanoïdes est en effet le plus abondant dans l'extrait entier avec 11,5 mg /100 mg par rapport aux flavonoïdes totaux avec 5 mg/100 mg (**Tableau VI**).

Concernant l'analyse qualitative et quantitative de l'extrait méthanolique du *Marrubium vulgare* dont le chromatogramme est présenté dans la **figure 19**, nous constatons qu'il n'existe pas une différence dans sa composition en comparaison avec la composition de l'extrait aqueux sauf la présence des terpènes qui apparaissent dans l'intervalle entre 50.00 et 55.00 min.

Marrubium vulgare

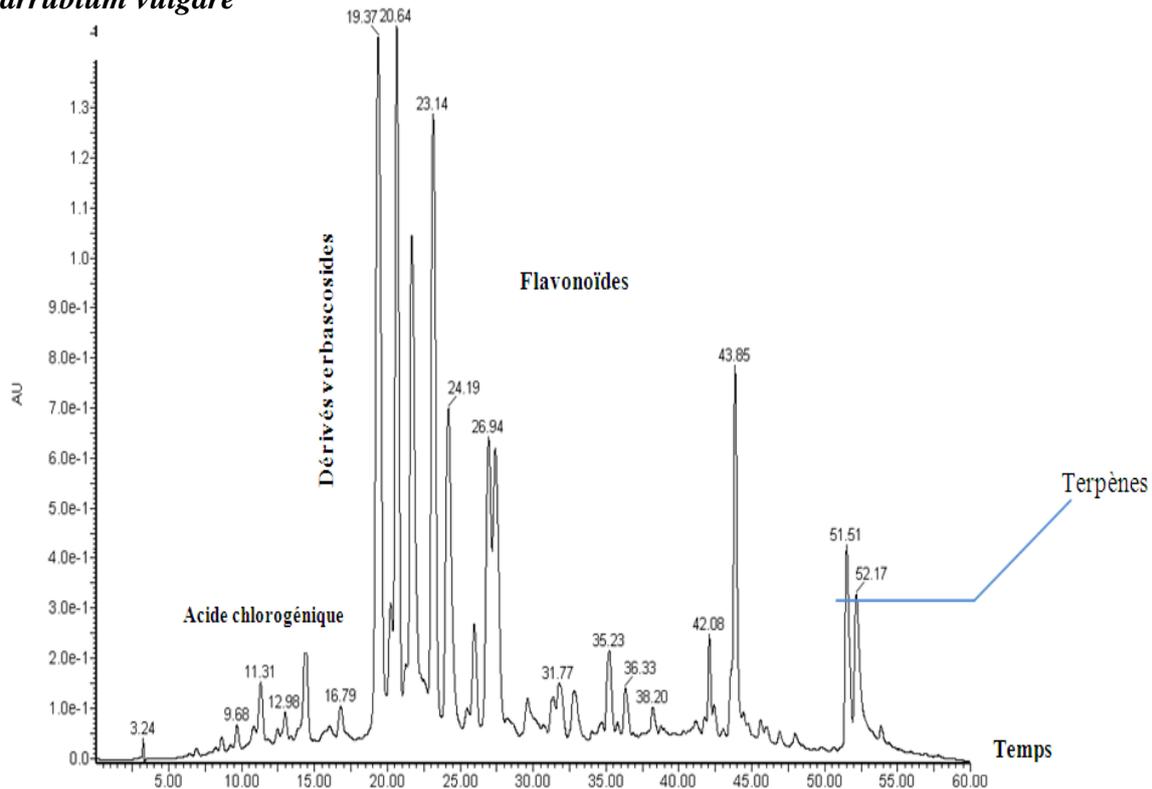


Figure 19 : Chromatogramme LC/MS de l'extrait méthanolique du *Marrubium vulgare* à 330 nm.

2.2.2. Extrait aqueux et méthanolique d'*Artemisia herba alba*

Les mêmes conditions analytiques ont été utilisées pour étudier la composition de l'extrait aqueux et méthanolique de l'armoise.

Les résultats obtenus sont consignés dans les chromatogrammes LC/MS des figures 20 et 21 et le tableau VII.

Artemisia herba alba

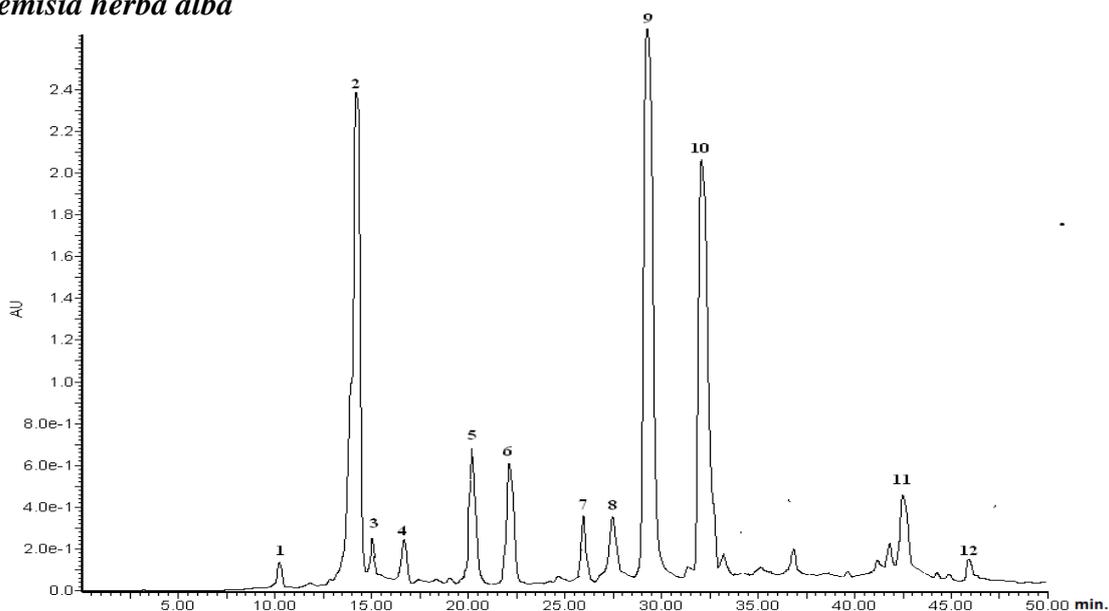


Figure 20 : Chromatogramme LC/MS de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* à 330 nm.

Artemisia herba alba

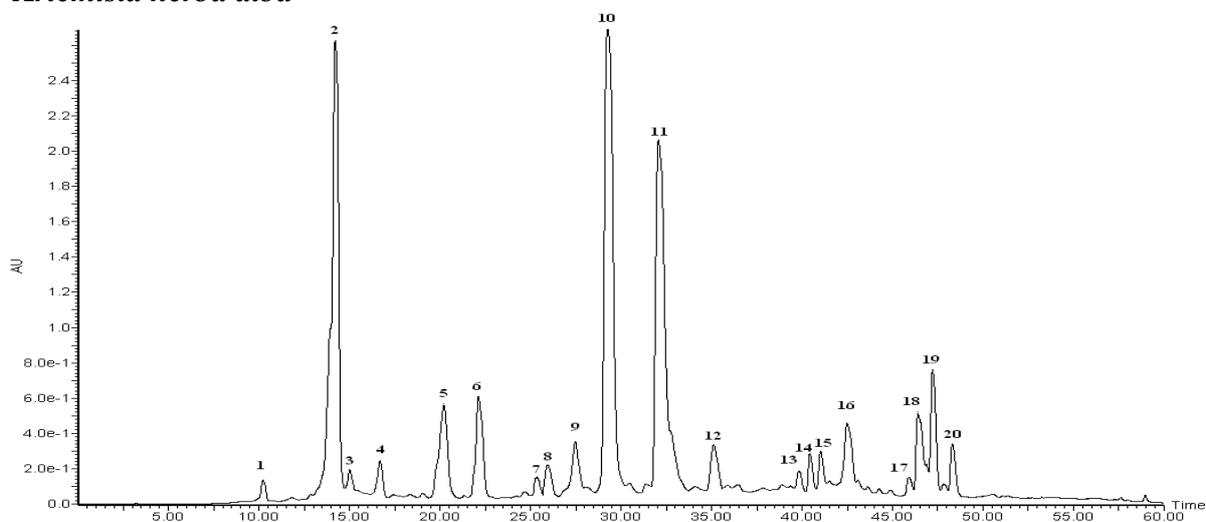


Figure 21 : Chromatogramme LC/MS de l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba* à 330 nm.

Tableau VII : Composition des extraits aqueux et méthanolique d'A *herba alba*.

Pics	Composés	Extrait aqueux	Extrait méthanolique
1	acide 3-caféoyl-quinique	+	+
2	acide 5- caféoyl-quinique (chlorogénique)	+	+
3	acide 4- caféoyl-quinique	+	+
4	vicénine 2 (apigénine 6,8 di-C-glucoside)	+	+
5	acide 5- <i>p</i> -coumaroyl- quinique	+	+
6	acide 4-feruloyl- quinique	+	+
7	lutéoline di-glucoside	-	+
8	vitexine (apigénine 8-C-glucoside)	+	+
9	acide 3,4 dicaféoylquinique	+	+
10	acide 3,5 dicaféoylquinique	+	+
11	acide 4,5 dicaféoylquinique	+	+
12-15	dérivés de masse élevée des acides cinnamoylquiniques	-	+
16	Diosmétine	+	+
17	apigénine (aglycone)	+	+
18-20	dérivés de polyméthoxy apigénine et lutéoline	-	+

La composition des deux types d'extraits ne diffère pas beaucoup et montre une richesse en polyphénols. Le chromatogramme peut être divisé en deux parties : la première, de 15.00 à 33.00 min où les polyphénols (composants majeurs) s'éluent tandis que les flavonoïdes (composants mineurs) au nombre de 14 apparaissent dans l'intervalle entre 35.00 et 55.00 min.

Les acides caféoyl quiniques, en particulier, la 5-caféoyl quinique (acide chlorogénique), les acides 3,5 et 4,5-dicaféoyl quiniques, sont les principaux composants (qualitativement et quantitativement) des deux extraits et représentent environ 70% de l'extrait total.

Dans ces extraits, les flavonoïdes sont présents à moindre mesure par rapport aux acides caféoyl quiniques, sont représentés par deux C-glycosides (vicénine 2 et vitexine) et par diosmétine et apigénine.

Dans l'extrait méthanolique, les quatre composants liés aux pics 12-15, sur la base de données de la spectrométrie de masse, peuvent être considérés comme des dérivés tri et tétra de l'acide cinnamoyl-quinique. Si on les compare le profil des deux extraits, il faut souligner

l'absence des pics attribués aux dérivés de l'apigénine et lutéoline méthoxylés (voir pics 18-20 du l'extrait méthanolique). Ces composants seraient probablement des résidus de la procédure d'extraction méthanolique. Malgré que l'identification soit incomplète, certains composés présents dans ces extraits, sont cités dans d'autres travaux tels que la lutéoline ou l'apigénine [70].

La structure des différentes molécules contenues dans les extraits sont présentées sur la figure 22.

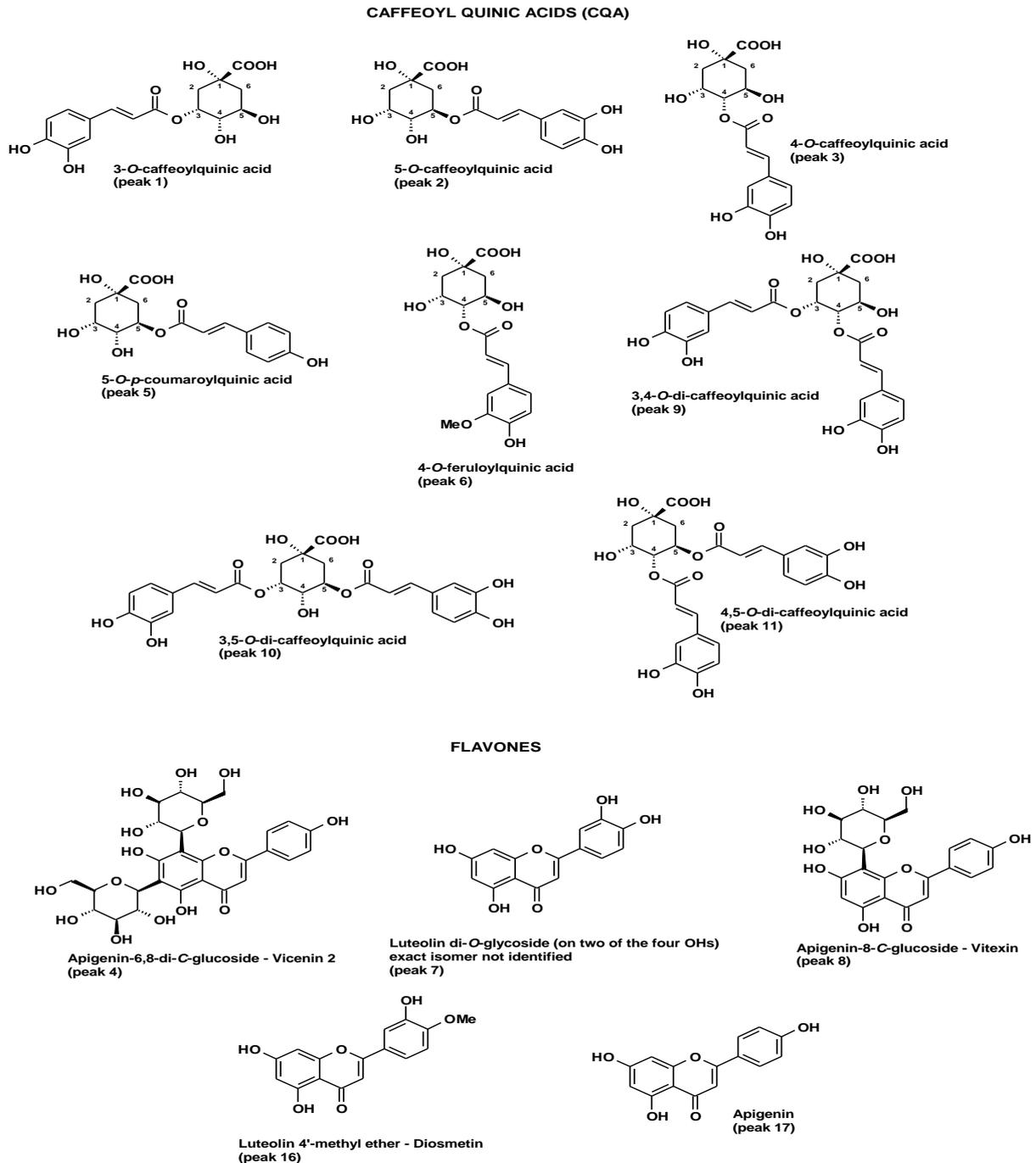


Figure 22 : Structure des composés identifiés dans l'extrait d'*Artemisia herba alba*.

2.2.3. Extrait aqueux et méthanolique d'*Ajuga iva*.

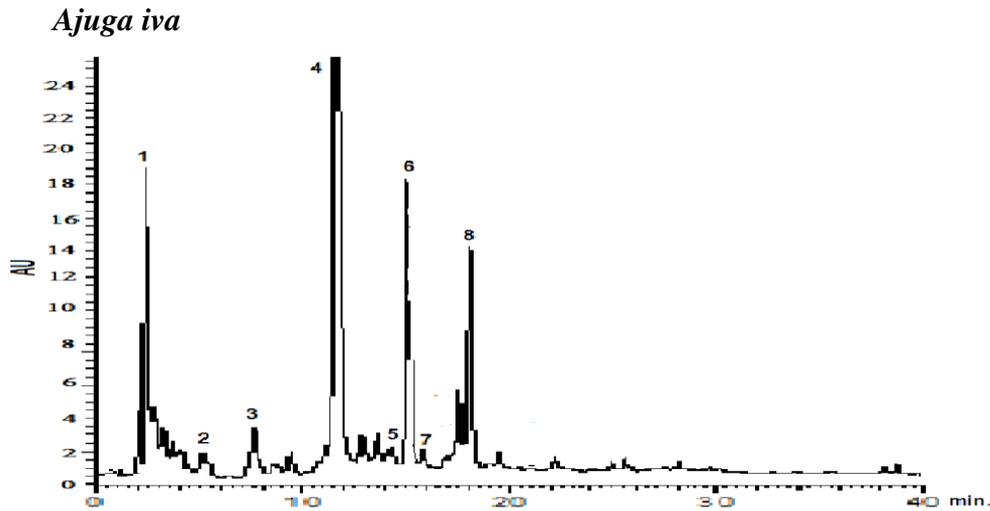


Figure 23: Chromatogramme LC/MS de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* à 330 nm

Tableau VIII: Composition de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva*

Pics	Composés
1	Apigénine
2	Apigénine hexoside
3	Apigénine rutinoside
4	Apigénine di-hexoside
5	Apigénine di-hexoside
6	Naringénine di-hexoside
7	Naringénine di-hexoside
8	Naringénine di-hexoside

Le profil de la composition de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* semble assez différent de l'extrait méthanolique, comparé à celui observé pour *A. herba alba*. La figure 23 et le tableau VIII montrent le profil de l'infusion aqueuse de cette plante. Sur la base d'une étude préliminaire, les principales composantes de cette infusion appartiennent à la classe flavonoïdique, à savoir les dérivés glycosides de l'apigénine et de la naringénine, détectée aussi dans l'extrait méthanolique. Une caractérisation provisoire montre la présence de l'apigénine ainsi que ses différents isomères (apigénine-di hexoside ou rutinoside) et des différents isomères de di-hexoside naringénine. Il est impossible de différencier les différents isomères avec précision. Par ailleurs d'autres composants mineurs sont présents, mais aussi

leur caractérisation n'est pas facile à l'heure actuelle. Un autre aspect important de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* par rapport à l'extrait méthanolique est l'absence de dérivés iridoïdes.

Ajuga iva

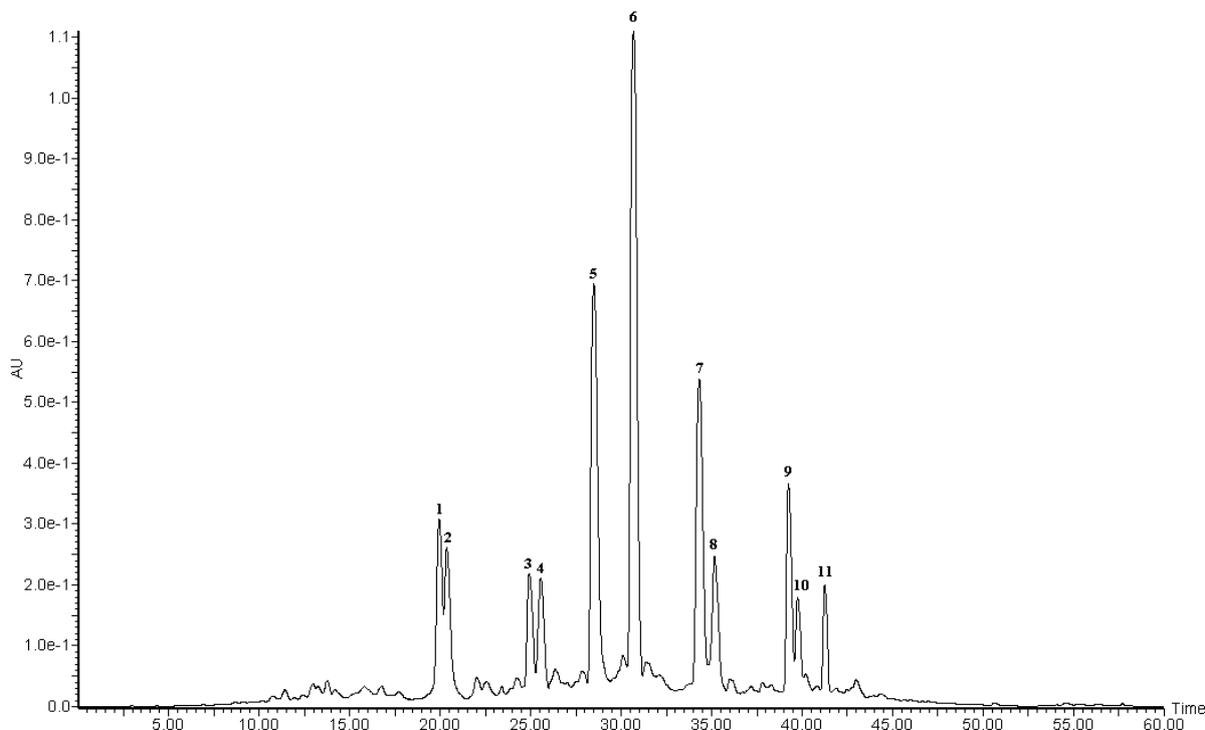


Figure 24: Chromatogramme LC/MS de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* à 330 nm.

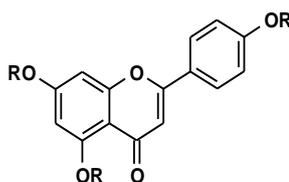
Tableau IX: Composition de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva*.

Pics	Composés
1	apigénine hexoside-pentoside
2	apigénine hexoside-pentoside (isomère)
3	apigénine di-hexoside
4	methyl-apigénine di-hexoside
5	naringénine rutinoside
6	apigénine rutinoside
7-11	probablement appartiennent à la classe des cinnamoyl-gluco iridoïdes (comme harpagide et harpagoside).

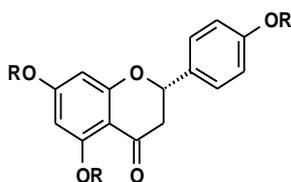
La figure 24 et le tableau IX montrent le profil HPLC de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva*. Dans ce cas, les principaux composants sont représentés par les dérivés de flavonoïdes, qui peuvent être classés comme des dérivés d'apigénine. Malheureusement, en raison du nombre élevé d'isomères, il est impossible, avec les seules données de spectrométrie de masse, d'établir la caractérisation exacte de la plupart de ces composants. Toutefois, les principaux

composés sont deux dérivés rutinosides de la naringénine et l'apigénine respectivement. Les derniers composés moins polaires, à savoir les pics 7-11, dans ce cas et sur la base des seules données de la spectrométrie de masse peuvent être provisoirement identifiés comme des dérivés iridoïdes, qui sont assez communs dans le genre *Ajuga* [71]. La structure des différentes molécules contenues dans les extraits sont présentées sur la **figure 25**.

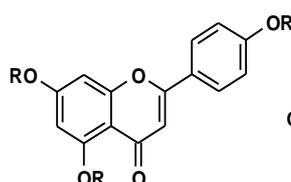
FLAVONOIDS



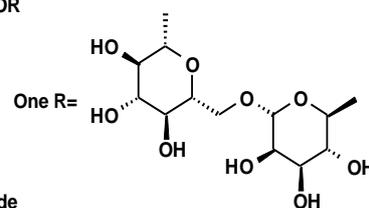
- Peak 1= Apigenin-di-O-glucoside (R=hexoside; R=pentoside; R=H)
- Peak 2= Apigenin-di-O-glucoside (R=hexoside; R=pentoside; R=H)
(two not identified positional isomers)
- Peak 3= Apigenin-di-O-glucoside (R=hexoside; R=hexoside; R=H)
(correct isomer not identified)
- Peak 4= methyl-Apigenin-di-O-glucoside (R= hexoside; R=hexoside; R=Me)



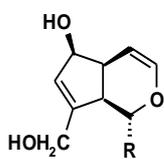
Peak 5= Naringenin-O-rutinoside
(correct isomer not identified)



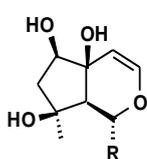
Peak 6= Apigenin-O-rutinoside
(correct isomer not identified)



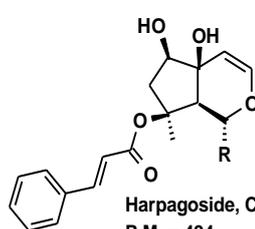
IRIDOIDS



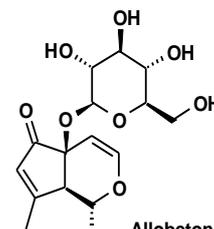
Aucubina, C₁₅H₂₂O₉
P.M. = 346



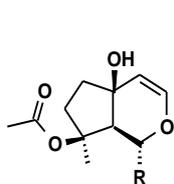
Harpagide, C₁₅H₂₄O₁₀
P.M. = 364



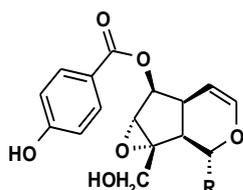
Harpagoside, C₂₄H₃₀O₁₁
P.M. = 494



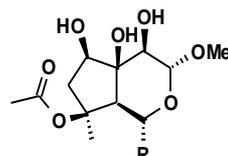
Allobetonoside, C₂₁H₃₀O₁₄
P.M. = 506



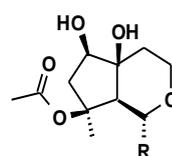
Reptoside, C₁₇H₂₆O₁₀
P.M. = 390



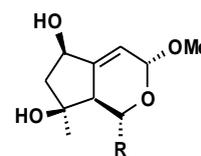
Catalposide, C₂₂H₂₆O₁₂
P.M. = 422



Ajureptaside A, C₁₈H₃₀O₁₃
P.M. = 454



Ajureptaside B, C₁₇H₂₈O₁₁
P.M. = 408



Ajureptaside C, C₁₆H₂₆O₁₀
P.M. = 378

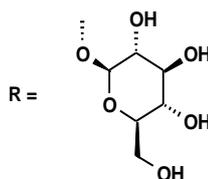


Figure 25 : Structure des composés identifiés dans l'extrait d'*Ajuga iva*.

3. Activités biologiques

3.1. Activité antidiabétique

3.1.1. Activité antidiabétique du *Marrubium vulgare*

3.1.1.1. Effets de l'extrait aqueux sur la glycémie

L'effet des différentes doses de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* sur la glycémie des rats diabétiques est présenté dans le **tableau X**.

Tableau X : Effet de l'extrait aqueux du *Marrubium vulgare* sur la glycémie

Lots	Dose (mg/kg)	Glycémie (moyenne ± écart type) (mg / dl)							% diminution glycémie
		Nombre de jours							
		1	3	5	7	9	11	13	
CS	-	100,00 ±0,89	99,83 ±0,75	98,83 ±0,75	98,16 ±0,75	100,50 ±1,05	99,66 ±0,81	99,16 ±0,75	0,84
DNT	-	^a 301,33 ±1,21	^a 345,17 ±1,17	^a 398,00 ±1,47	^a 414,83 ±0,75	^a 445,17 ±0,75	^a 472,33 ±1,03	^a 484,33 ±0,82	(+) 60,73
DTM	5	379,8 ±1,17	332,83 ±1,72	286,17 ±1,47	225,17 ±1,17	179,17 ±1,33	149,17 ±0,75	129,50 ±1,05	(-) 65,90
DT <i>Marrubium vulgare</i>	100	387,50 ±1,05	360,50 ±1,05	301,15 ±1,05	287,00 ±0,89	247,17 ±0,98	229,67 ±1,21	190,83 ±0,98	(-) 50,75
	200	320,17 ±1,33	283,00 ±0,89	211,00 ±0,89	171,33 ±1,21	146,83 ±0,98	130,17 ±1,17	124,67 ±1,21	(-) 61,06
	300	381,00 ±0,89	360,67 ±0,82	288,00 ±0,89	198,33 ±0,82	163,50 ±1,38	155,33 ±1,21	142,67 ±1,21	(-) 62,55

^a p < 0,001 Lorsque le lot des sains est comparé au lot diabétique contrôle. ^b p < 0,001 Lorsque les différents groupes diabétiques traités sont comparés au groupe diabétique contrôle.

Les résultats montrent que dans le groupe diabétique non traité, les taux de glucose sont 3 à 4 fois plus élevés que ceux du groupe contrôle sain. Une baisse dans le niveau de glucose sanguin a été observé à partir du 5^{ème} jour après le traitement des rats diabétiques tant pour les doses 200 que 300 mg/kg p.c. de *Marrubium vulgare* et aussi dans le groupe traité avec le médicament de référence, le glibenclamide. Le traitement par l'extrait à la dose de 300 mg/kg p.c. a montré une baisse plus efficace de la glycémie (- 62.5%) comparable au médicament de référence (-65,90%).

Ces résultats montrent la grande efficacité de l'infusé de *Marrubium vulgare* dans la diminution du taux de glucose sanguin, ce qui confirme que cette plante médicinale peut être considérée comme un puissant agent dans le traitement du diabète [72]. Par ailleurs, au cours de ces dernières années de nouveaux médicaments bioactifs hypoglycémiant, isolés à partir

de plantes ont montré une activité antidiabétique avec plus d'efficacité [73]. Cette activité antidiabétique est attribuée à la richesse de l'extrait aqueux du marrube en flavonoïdes et verbascosides connus pour leurs activités antidiabétique et dont le mécanisme pourrait être une stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta des îlots et / ou l'inhibition du processus de dégradation de l'insuline [74].

3.1.1.2. Effets de l'extrait aqueux sur le poids corporel

Les résultats présentés dans le **tableau XI** montrent des changements dans le poids corporel parmi des rats diabétiques et normaux.

Tableau XI : Effet de l'extrait aqueux sur le poids corporel.

Lots	Dose (mg / kg)	Poids corporel (g)			
		Nombre de jours			
		1	5	10	15
CS	-	182,83 ± 0,98	188,67 ± 1,75	190,33 ± 2,66	197,50 ± 1,64
DNT	-	199,33 ± 0,82	190,83 ± 1,47	184,83 ± 1,72	174,33 ± 1,37
DTM	5	198,33 ± 1,63	186,83 ± 1,94	189,83 ± 1,83	192,67 ± 1,97
DT <i>Marrubium vulgare</i>	100	195,83 ± 1,47	192,50 ± 2,07	196,67 ± 1,75	200,33 ± 1,21
	200	197,00 ± 1,79	195,17 ± 0,75	201,17 ± 2,14	204,17 ± 1,47
	300	198,33 ± 1,03	197,17 ± 1,60	200,50 ± 1,87	204,33 ± 1,75

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 6).

Un gain de poids corporel normal a été observé dans les groupes CS, DTM, DT100, DT200 et DT300. Cependant, une diminution significative de gain de poids corporel a été observée avec le groupe diabétique non traités, car au cours du diabète, la diminution du poids est due à des processus cataboliques tels que la glycogénolyse, la lipolyse et la protéolyse [75]. Les groupes diabétiques traités ont montrés un signe de rétablissement dans le poids corporel. Au contraire, le groupe diabétique non traité a montré une chute progressive dans le poids corporel durant toute la période expérimentale.

3.1.1.3. Effet de l'extrait aqueux sur les différents paramètres biochimiques

Le **tableau XII** regroupe les résultats obtenus des différents paramètres biochimiques dosés après le sacrifice des rats

Tableau XII: Paramètres biochimiques après le sacrifice des rats

Paramètres	Lots					
	CS	DNT	DTM	DT 100	DT 200	DT 300
Glucose (mg/dl)	100.33±0.82	498.17±0.75	120.67±1.21	187.33±0.82	115.33±0.82	136.00±0.89
Cholestérol (mg/dl)	77.39±1.02	176.29±3.26	125.37±1.75	97.63±1.25	79.21±1.10	110.30±1.69
Triglycérides (mg/dl)	88.42±1.88	154.62±4.56	103.01±1.19	129.33±1.55	102.76±1.39	100.89±1.44
Protéines totales (mg/dl)	59.48±0.89	78.44±1.02	68.89±1.50	78.88±1.20	73.33±0.55	76.29±0.78
Lipides totaux (mg/dl)	381.51±4.30	778.44±6.49	469.60±4.66	489.50±5.69	398.24±4.98	490.70±4.14
HDL (mg/dl)	40.59±1.01	33.60±0.65	38.29±0.89	35.20±0.66	37.38±0.67	39.67±0.98
LDL (mg/dl)	84.71±1.30	87.68±1.33	87.39±0.68	84.89±1.68	83.20±1.28	83.60±1.01
TGO (UI/L)	33.80±1.60	39.49±1.67	37.50±1.22	34.60±1.78	35.17±1.16	34.99±1.72
TGP (UI/L)	27.69±1.20	37.21±1.44	34.50±1.58	35.88±0.97	32.52±1.06	32.80±0.79
Urée (mg/dl)	34.20±1.32	55.41±1.19	46.37±2.01	46.48±1.30	39.91±1.70	39.19±1.68
Créatinine (mg/dl)	0.25±0.01	0.67±0.05	0.58±0.01	0.63±0.01	0.59±0.02	0.60±0.02

Les valeurs sont la moyenne ± écart type (n= 6 rats).

Après le traitement des rats diabétiques par l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* pendant deux semaines et après leur sacrifice; l'analyse des résultats a montré une diminution significative de la concentration sérique du glucose chez les rats traités aux doses 100 mg, 200 mg et 300 mg/kg du poids corporel par rapport aux rats DNT, notons que l'effet antihyperglycémique obtenu est dose-dépendant.

Les résultats obtenus révèlent aussi une augmentation bien claire de la concentration sérique du profil lipidique chez les rats diabétiques non traités. Cette augmentation peut s'expliquer par la dégradation intense des composés lipidiques des tissus adipeux. L'administration orale de l'infusion de *Marrubium vulgare* et notamment aux doses 200 mg et 300 mg/kg de p.c. a diminué considérablement la cholestérolémie, la lipidémie et le taux sérique des triglycérides chez les rats diabétiques.

Nous avons constaté également chez le lot diabétique non traité une augmentation de la teneur sérique en urée et en créatinine considéré comme marqueurs significatifs du dysfonctionnement rénal [76]. En revanche le taux sérique des protéines totales est diminué. Ceci est expliqué par le fait que les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine. Nos résultats suggèrent que l'augmentation de la concentration sérique de la créatinine et d'urée causée par le diabète a été déclinée après l'administration de l'extrait aqueux.

En ce qui concerne les paramètres enzymatiques, nous avons remarqué une augmentation de l'activité des transaminases (TGO et TGP) dans le sérum des rats diabétiques non traités par rapport à celle du contrôle. Ce qui explique l'accumulation des acides aminés comme l'alanine et le glutamate dans le sérum provenant de la dégradation des composés protéiques du corps. De ce fait, ces acides aminés peuvent se transformer sous l'action des transaminases sériques en composés carboxyliques tel que l' α cétooglutarate et le pyruvate.

Ce qui implique alors une forte activité enzymatique de TGO et TGP. Ceci peut être expliqué aussi par l'effet hépatotoxique de l'Alloxane. En revanche, le traitement des rats diabétiques par l'extrait du marrube blanc a rétabli les valeurs à la normale [76].

3.1.2. Activité antidiabétique d'*Artemisia herba alba*

3.1.2.1. Effets de l'extrait aqueux sur la glycémie

L'effet des différentes doses de l'extrait aqueux de l'armoise et du médicament sur la glycémie des rats sains et diabétiques est présenté dans le **Tableau XIII**.

Tableau XIII: Effet de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* sur la glycémie

Lots	Dose (mg/kg)	Glycémie (moyenne ± écart type) (mg / dl)							% Diminution glycémie
		Nombre de jours							
		1	3	5	7	9	11	13	
CS	-	100,00 ± 0,89	99,83 ± 0,75	98,83 ± 0,75	98,16 ± 0,75	100,50 ± 1,05	99,66 ± 0,81	99,16 ± 0,75	0,84
DNT	-	301,33 ± 1,21 ^a	345,17 ± 1,17 ^a	398,00 ± 1,47 ^a	414,83 ± 0,75 ^a	445,17 ± 0,75 ^a	472,33 ± 1,03 ^a	484,33 ± 0,82 ^a	(+) 60,73
DTM	5	379,83 ± 1,17	332,83 ± 1,72	286,17 ± 1,47 ^b	225,17 ± 1,17 ^b	179,17 ± 1,33 ^b	149,17 ± 0,75 ^b	129,50 ± 1,05 ^b	(-) 65,90
DT <i>Artemisia herba alba</i>	100	320,17 ± 1,17	292,50 ± 1,87	217,67 ± 1,75 ^b	150,00 ± 1,41 ^b	120,50 ± 1,87 ^b	104,83 ± 1,47 ^b	101,17 ± 1,94 ^b	(-) 68,40
	200	352,50 ± 1,87	302,67 ± 1,63	132,50 ± 1,63 ^b	111,84 ± 1,94 ^b	124,67 ± 1,63 ^b	101,17 ± 1,47 ^b	100,50 ± 1,87 ^b	(-) 71,49
	300	383,50 ± 1,64	279,00 ± 1,41 ^b	163,17 ± 1,47 ^b	122,50 ± 1,87 ^b	114,67 ± 1,75 ^b	103,83 ± 1,07 ^b	100,17 ± 1,17 ^b	(-) 73,88

^a p < 0,001 lorsque le lot des sains est comparé au lot diabétique contrôlé. ^b p < 0,001 lorsque les différents groupes diabétiques traités sont comparés au groupe diabétique contrôlé.

Les résultats montrent une différence significative dans la glycémie du groupe diabétique non traités et du groupe contrôle sain. Ce résultat confirme l'installation du diabète après l'injection de l'Alloxane. Ce dernier est un produit diabétogène avec une toxicité sur les cellules β des îlots du pancréas via le transporteur de glucose, GLUT2 [42]. Une baisse dans le niveau de glucose de sang a été observée après le traitement des rats diabétiques avec les doses 100, 200 et 300 mg/kg p.c. de l'armoise et avec le médicament de référence, le glibenclamide. Le traitement par l'extrait à la dose de 300 mg/kg p.c. a montré une baisse plus significative de la glycémie (- 73.88%), plus importante qu'avec le médicament de référence. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux qui confirment l'effet antidiabétique de cette plante, soit sur des rats [77], des souris [78] et même sur des lapins [79]. Cette activité antidiabétique est due à la présence des flavonoïdes dans l'extrait montré par l'étude phytochimique.

3.1.2.2. Effets de l'extrait aqueux sur le poids

Le **Tableau XIV** regroupe les résultats obtenus de la variation du poids corporel après 15 jours de traitement des rats par l'infusion et le médicament.

Tableau XIV : Effet de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* sur les poids corporels.

Lots	Dose (mg / kg)	Poids corporel (g)			
		Nombre de jours			
		1	5	10	15
CS	-	182,83 ± 0,98	188,67 ± 1,75	190,33 ± 2,66	197,50 ± 1,64
DNT	-	199,33 ± 0,82	190,83 ± 1,47	184,83 ± 1,72	174,33 ± 1,37
DTM	5	198,33 ± 1,63	186,83 ± 1,94	189,83 ± 1,83	192,67 ± 1,97
DT <i>Artemisia herba alba</i>	100	181,50 ± 1,38	184,33 ± 1,03	186,83 ± 0,98	191,17 ± 0,98
	200	198,50 ± 1,38	201,67 ± 1,75	205,83 ± 1,72	210,50 ± 1,87
	300	191,33 ± 1,63	194,17 ± 1,60	197,00 ± 1,41	201,67 ± 1,51

Les valeurs sont la moyenne ± écart type (n= 6 rats).

Dans ces conditions expérimentales, on a enregistré un déficit pondéral chez les rats diabétiques non traités suite à l'injection de l'Alloxane. Cet effet peut être dû au manque d'insuline qui conduit à la dégradation des lipides et des protéines structurales qui sont connues par leur contribution au poids corporel [75]. Par ailleurs, le groupe contrôle sain a subi durant toute la période expérimentale une augmentation régulière du poids, liée à la croissance des animaux.

L'administration orale de l'extrait aqueux de l'armoise a induit une augmentation remarquable du poids par rapport aux rats diabétiques non traités surtout chez le lot traité par la dose 200 mg/kg de p.c. Un rétablissement dans le poids est aussi observé dans le groupe diabétique traité avec le médicament.

3.1.2.3. Effets de l'extrait aqueux sur les paramètres biochimiques

Le **tableau XV** montre les résultats obtenus des différents paramètres biochimiques dosés après le sacrifice des rats.

Tableau XV : Paramètres biochimiques après le sacrifice des rats

Paramètres	Lots					
	CS	DNT	DTM	DT 100	DT 200	DT 300
Glucose (mg/dl)	100.33±0.82	498.17±0.75	120.67±1.21	93.00±0.97	102.00±1.12	94.80±1.23
Cholestérol (mg/dl)	77.39±1.02	176.29±3.26	125.37±1.75	138.80±2.01	118.50±1.09	122.40±1.29
Triglycérides (mg/dl)	88.42±1.88	154.62±4.56	103.01±1.19	113.40±3.23	124.00±1.11	114.40±0.99
Protéines totales (mg/dl)	59.48±0.89	78.44±1.02	68.89±1.50	78.13±0.33	58.19±0.88	50.75±1.40
Lipides totaux (mg/dl)	381.51±4.30	778.44±6.49	469.60±4.66	390.66±5.90	420.00±4.03	379.85±3.31
HDL (mg/dl)	40.59±1.01	33.60±0.65	38.29±0.89	42.20±0.87	36.78±1.20	32.80±0.96
LDL (mg/dl)	84.71±1.30	87.68±1.33	87.39±0.68	86.60±0.50	83.00±1.32	85.60±0.56
TGO (UI/L)	33.80±1.60	39.49±1.67	37.50±1.22	32.10±1.05	35.67±0.90	30.77±1.64
TGP (UI/L)	27.69±1.20	37.21±1.44	34.50±1.58	25.75±1.22	32.45±2.00	30.25±1.19
Urée (mg/dl)	34.20±1.32	55.41±1.19	46.37±2.01	44.80±1.11	40.25±0.97	42.80±1.62
Créatinine (mg/dl)	0.25±0.01	0.67±0.05	0.58±0.01	0.70±0.07	0.10±0.01	0.60±0.05

Les valeurs sont la moyenne ± écart type (n = 6 rats).

L'insulinodéficience due à l'Alloxane, cause inévitablement une lipolyse progressive [75] résorbant les stocks graisseux, ce qui intensifie le comportement polyphagique insulinodépendant. Effectivement, les rats diabétiques non traités montrent une hyperglycémie, Hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie et une hyperlipidémie très importante par rapport aux rats sains.

Ces déviations biochimiques ont été considérablement corrigées par l'administration de l'extrait aqueux à différentes doses. Les résultats montrent que les concentrations sériques des HDL et LDL sont très voisines chez les quatre lots expérimentaux tout au long de la durée de l'expérimentation.

3.1.3. Activité antidiabétique d'*Ajuga iva*

3.1.3.1. Effets de l'extrait aqueux sur la glycémie

Le résultat du traitement oral, deux fois par jour, des rats sains et diabétiques, par le glibenclamide et l'extrait aqueux de l'*Ajuga* est résumé dans le **tableau XVI**.

Tableau XVI: Effet de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* sur la glycémie

Lots	Dose (mg / kg)	Glycémie (moyenne ± écart type) (mg / dl)							% Diminution glycémie
		Nombre de jours							
		1	3	5	7	9	11	13	
CS	-	100,00 ± 0,89	99,83 ± 0,75	98,83 ± 0,75	98,16 ± 0,75	100,50 ± 1,05	99,66 ± 0,81	99,16 ± 0,75	0,84
DNT	-	301,33 ± 1,21 ^a	345,17 ± 1,17 ^a	398,00 ± 1,47 ^a	414,83 ± 0,75 ^a	445,17 ± 0,75 ^a	472,33 ± 1,03 ^a	484,33 ± 0,82 ^a	(+) 60,73
DTM	5	379,83 ± 1,17	332,83 ± 1,72	286,17 ± 1,47 ^b	225,17 ± 1,17 ^b	179,17 ± 1,33 ^b	149,17 ± 0,75 ^b	129,50 ± 1,05 ^b	(-) 65,90
DT <i>Ajuga iva</i>	100	331.17 ± 1.94	270.83 ± 1.47	190.00 ± 1.41 ^b	161.67 ± 2.16 ^b	124.67 ± 1.86 ^b	106.50 ± 2.17 ^b	100.00 ± 1.41 ^b	(-) 69.80
	200	365.00 ± 1.41	269.83 ± 1.47 ^b	159.50 ± 1.87 ^b	142.00 ± 1.67 ^b	107.67 ± 1.75 ^b	100.67 ± 1.37 ^b	100.00 ± 0.63 ^b	(-) 72.60
	300	363.17 ± 1.47	189.17 ± 1.47 ^b	155.50 ± 2.17 ^b	123.50 ± 1.87 ^b	113.33 ± 1.97 ^b	103.17 ± 1.72 ^b	99.17 ± 1.94 ^b	(-) 72.69

^a p < 0,001 Lorsque le lot des sains est comparé au lot diabétique contrôlé. ^b p < 0,001 Lorsque les différents lots diabétiques traités sont comparés au lot diabétique contrôlé.

Le diabète alloxanique est caractérisé par une destruction sélective des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas avec comme conséquence une installation du diabète qui se traduit par une hyperglycémie permanente ; ceci est observé dans le groupe diabétique non traité ou la glycémie ne cesse d'augmenter durant toute l'expérimentation.

Dans le lot contrôle sain, aucune modification importante de la glycémie n'est observée. Dans les mêmes conditions, le glibenclamide, antidiabétique oral provoque une diminution significative (p< 0,001) du taux de glucose sanguin chez les rats diabétiques. L'extrait aqueux de l'ivette induit une activité anti hyperglycémiant au bout de 15 jours de traitement chez les groupes diabétiques traités. Le pourcentage de diminution est assez important avec les trois doses 100, 200 et 300 mg/Kg.

L'ivette est connue comme plante hypoglycémiante [13], les résultats obtenus dans cette étude, confirment son utilisation dans la médecine traditionnelle en tant que plante antidiabétique. Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs chercheurs qui ont montré une réduction de la glycémie de 77% par cette plante [80,81].

3.1.3.2. Effets de l'extrait aqueux sur le poids

L'influence de l'administration de l'extrait aqueux de l'*Ajuga iva* sur le poids corporel est rapportée dans le **Tableau XVII**.

Tableau XVII : Effet de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* sur les poids corporels.

Lots	Dose (mg / kg)	Poids corporels(g)			
		Nombre de jours			
		1	5	10	15
CS	-	182,83 ± 0,98	188,67 ± 1,75	190,33 ± 2,66	197,50 ± 1,64
DNT	-	199,33 ± 0,82	190,83 ± 1,47	184,83 ± 1,72	174,33 ± 1,37
DTM	5	198,33 ± 1,63	186,83 ± 1,94	189,83 ± 1,83	192,67 ± 1,97
DT <i>Ajuga iva</i>	100	185,83 ± 1,47	188,00 ± 1,79	191,83 ± 1,83	196,17 ± 1,94
	200	198,17 ± 1,94	200,67 ± 1,86	203,33 ± 1,63	207,50 ± 1,64
	300	199,50 ± 0,84	203,00 ± 1,41	206,83 ± 1,94	210,33 ± 1,75

Les valeurs sont la moyenne ± écart type (n = 6 rats).

Les résultats obtenus ont montré une perte sévère du poids corporel chez le lot de rats diabétiques non traités qui est de l'ordre de (-12,54 %). Par ailleurs, le groupe sain témoin a subi durant la même période une augmentation régulière de (+ 08.02%). Chez les groupes diabétiques traités, l'administration par gavage de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* à la dose quotidienne de 300 mg/kg pendant deux semaines a induit un changement du poids corporel par rapport au groupe diabétique contrôle.

D'après le **tableau XVII**, une diminution du poids est constatée dans le groupe diabétique traité par le glibenclamide ; un rétablissement du poids des rats du même lot est observé à partir du 10^{ème} jour.

3.1.3.3. Effets de l'extrait aqueux sur les paramètres biochimiques

La variation de la glycémie et des différents paramètres biochimiques après le sacrifice des rats est consignée au **Tableau XVIII**.

Tableau XVIII : Paramètres biochimiques après le sacrifice des rats

Paramètres	Lots					
	CS	DNT	DTM	DT 100	DT 200	DT 300
Glucose (mg/dl)	100.33±0.82	498.17±0.75	120.67±1.21	93.00±0.97	102.00±2.11	94.80±1.32
Cholestérol (mg/dl)	77.39±1.02	176.29±3.26	125.37±1.75	88.80±0.84	79.50±1.19	91.40±0.29
Triglycérides (mg/dl)	88.42±1.88	154.62±4.56	103.01±1.19	100.40±1.23	97.00±1.27	85.00±1.00
Protéines totales (mg/dl)	59.48±0.89	78.44±1.02	68.89±1.50	75.41±0.43	57.19±1.08	62.70±1.30
Lipides totaux (mg/dl)	381.51±4.30	778.44±6.49	469.60±4.66	356.44±3.15	370.74±3.63	342.85±2.25
HDL (mg/dl)	40.59±1.01	33.60±0.65	38.29±0.89	39.95±0.57	32.18±0.20	44.09±0.46
LDL (mg/dl)	84.71±1.30	87.68±1.33	87.39±0.68	85.06±0.84	89.10±0.32	80.06±1.06
TGO (UI/L)	33.80±1.60	39.49±1.67	37.50±1.22	30.10±1.15	34.67±0.63	40.77±0.64
TGP (UI/L)	27.69±1.20	37.21±1.44	34.50±1.58	35.57±0.22	26.45±1.10	29.00±1.09
Urée (mg/dl)	34.20±1.32	55.41±1.19	46.37±2.01	41.08±1.17	39.25±1.97	36.34±0.62
Créatinine (mg/dl)	0.25±0.01	0.67±0.05	0.58±0.01	0.48±0.03	0.37±0.01	0.66±0.05

Les valeurs sont la moyenne ± écart type (n = 6 rats).

Dans ce tableau, l'*Ajuga iva*, à différentes doses a rétablit la glycémie des rats diabétiques à la valeur normale. Il existe une différence significative entre les valeurs du profil lipidique des rats diabétiques par rapport aux rats du lot contrôle sain. On constate que l'ivette possède une action hypolipidémique puisque le profil lipidique (lipides totaux, triglycérides et cholestérol) des rats diabétiques traités par l'extrait aqueux de la plante a intégré les valeurs normales en comparaison avec celui des rats diabétiques non traités.

Ces résultats ont été confirmés dans plusieurs études qui traitent de l'action hypolipidémique de l'*Ajuga* [82,83].

3.2. Activité antioxydante

La méthode DPPH a été choisie, en raison de sa simplicité, rapidité, sensibilité et de sa reproductibilité, mais aussi parce que les mesures IC50 exprimées en mg/ml sont comparables entre elles et non pas seulement à celle d'une référence.

L'inhibition du DPPH radicalaire a été évaluée pour chaque extrait de plante et les résultats sont présentés dans le **Tableau XIX**. Une valeur faible d'IC50 indique une activité antioxydante forte. Le pourcentage d'inhibition (% I) pour chaque extrait méthanolique a été calculé. La valeur d'IC50, la concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du

DPPH radicalaire, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés.

D'après le **Tableau XIX**, on remarque que l'activité antioxydante de l'extrait du *Marrubium vulgare* a été la plus importante parmi les autres. L'ordre d'efficacité est le suivant : *Marrubium vulgare* > *Artemisia herba alba* > *Ajuga iva*.

Tableau XIX : Activité antioxydante des extraits méthanoliques des 3 plantes.

Extraits	IC50/DPPH (mg/ml)
<i>Artemisia herba alba</i>	0.56 ± 0.2
<i>Ajuga iva</i>	15.04 ± 1.02
<i>Marrubium vulgare</i>	0.49 ± 0.1

L'activité anti-radicalaire des extraits est donc relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Par exemple l'extrait méthanolique de l'*Ajuga iva* qui représente la fraction la plus faible en polyphénols, possède l'effet scavenger le plus bas par rapport aux autres extraits.

Malgré la richesse de l'*Artemisia herba alba* en polyphénols, c'est le *Marrubium vulgare* qui a donné un meilleur résultat de l'activité antioxydante, ceci est peut être du a la méthode de dosage des polyphénols totaux choisie qui ne donne pas une teneur exacte de l'extrait [64]. Les résultats de cette activité sont en accord avec d'autres études [63,65].

3.3. Activité antileishmanienne

Les résultats des cultures des formes promastigotes, en absence et en présence des extraits méthanoliques des trois plantes, sont résumés dans le **tableau XX**. L'IC50 (concentration de l'échantillon qui inhibe 50% de la croissance du parasite) est déterminée par interpolation linéaire, sur des courbes donnant l'inhibition en pourcentage en fonction de la concentration testée.

Tableau XX: IC50 (µg/ml) des extraits méthanoliques des 3 plantes.

Extraits	IC50 (µg/ml)
<i>Artemisia herba alba</i>	10
<i>Ajuga iva</i>	10
<i>Marrubium vulgare</i>	25

Les substances d'origine végétale ont toujours constitué une source majeure pour l'élaboration de nouvelles substances aux propriétés thérapeutiques. La richesse de la composition chimique des plantes étudiée par LC/MS, nous a amenés à évaluer l'activité des extraits méthanoliques vis-à-vis des formes promastigotes de *Leishmania infuntum*.

Les résultats obtenus montrent une IC50 comprise entre 10 et 25 µg/ml. Selon l'échelle d'évaluation de l'activité leishmanicide, cette IC50 indique une bonne activité pour les trois extraits de plante. Ceci s'explique par la teneur élevée des extraits en principes actifs tels que polyphénols et flavonoides. À notre connaissance, il s'agit de la première mention de l'activité leishmanicide de l'*Ajuga iva*. Les études menées par plusieurs chercheurs ont contribué à la mise en évidence du pouvoir leishmanicide de l'*Artemisia herba alba* et du *Marrubium vulgare* [23, 84].

3.4. Activité antimicrobienne

Les activités antibactérienne et antifongique des extraits sont estimées par le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques, exprimée en mm. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau XXI**.

Le DMSO sans extrait a été utilisé en tant que contrôle négatif et n'a montré aucun effet inhibiteur sur la croissance microbienne.

Tableau XXI: Activité antimicrobienne des extraits méthanoliques

Extractions	Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
	<i>Ajuga iva</i>	<i>Artemisia herba alba</i>	<i>Marrubium vulgare</i>
Souches			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	12 ± 0.6	18 ± 0.7	16 ± 0.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853	08 ± 0.2	14 ± 0.2	09 ± 0.1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11 ± 0.2	13 ± 0.6	12 ± 0.3
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	10 ± 0.3	15 ± 0.2	10 ± 0.1

On peut considérer une activité antimicrobienne si le diamètre de la zone d'inhibition observé autour du disque de papier Wattman est supérieur ou égal à 9 mm. Généralement les diamètres des zones d'inhibition obtenues avec les bactéries gram positifs sont plus importants que ceux obtenus avec les bactéries gram négatifs [85].

Plusieurs recherches scientifiques ont prouvé l'efficacité de l'extrait ou de l'huile essentielle de l'*Artemisia herba alba* aussi bien sur des bactéries que des levures [86,87], ce qui confirme les résultats obtenus lors de cette étude. Le pouvoir antimicrobien des extraits d'*Ajuga iva* et du *Marrubium vulgare* est moins important, en comparaison avec celui de l'*Artemisia*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La phytothérapie peut constituer une médecine alternative ou au moins comme un complément à la pharmacie classique. La nécessité de trouver de nouvelles molécules reste une priorité de santé publique.

A l'heure actuelle, l'Algérie est un pays riche en termes de biodiversité, et l'usage des pharmacopées traditionnelles est encore une pratique bien vivante. Ces pharmacopées traditionnelles comportent des traitements pour soigner plusieurs pathologies et il est donc toujours d'actualité de penser que de nouvelles molécules puissent continuer à être isolées des plantes locales spontanées.

Le principal objectif portait sur la valorisation pharmacologique de trois plantes issues de cette biodiversité végétale. Le choix de ces plantes était basé sur la fréquence de leurs utilisations par la population locale. L'évaluation pharmacologique s'est faite selon le résultat de l'enquête ethnobotanique.

Une étude phytochimique qualitative montre que tous les groupes chimiques identifiés au niveau de l'extrait aqueux des plantes se retrouvent dans la préparation traditionnelle (infusion de la partie aérienne). La méthode d'extraction utilisée en médecine traditionnelle est donc du point de vue qualitatif aussi efficace que la méthode d'extraction par le méthanol. L'abondance en principes actifs confère aux trois plantes des propriétés pharmacologiques remarquables, ce qui pourrait justifier leurs multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elles sont utilisées en tradithérapie.

D'un point de vue quantitatif, les extraits aqueux et méthanoliques de l'armoise et du marrube ne diffère pas beaucoup dans la composition, et sont caractérisés par une richesse en polyphénols et en flavonoïdes. La composition de l'extrait aqueux de l'ivette diffère de l'extrait méthanolique par la présence d'iridoïdes dans ce dernier.

Les extraits des trois plantes, *Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare* ont été testés pour vérifier leurs pouvoir antidiabétiques, leishmanicides, antioxydants et antimicrobiens.

Les résultats sur l'ensemble des tests biologiques des extraits montrent que les extraits aqueux des trois plantes possèdent une activité antidiabétique importante avec un pourcentage de diminution de la glycémie allant de 50.75 % jusqu'à 72.69 %. Cette diminution est supérieure ou comparable, selon la plante, à celle du médicament de référence, le glibenclamide (65.90%). Certains paramètres biochimiques indicateurs de

déviations métaboliques ont pratiquement été rétablis aux valeurs normales si on les compare avec le bilan des rats diabétiques non traités.

L'activité antiradicalaire est dépendante du contenu en flavonoïdes et en polyphénols totaux des extraits. Malgré la richesse de l'*Artemisia herba alba* en polyphénols c'est le *Marrubium vulgare* qui a donnée le meilleur pouvoir antioxydant.

L'étude de l'activité antileishmanienne montre que tous les extraits testés possèdent une bonne activité inhibitrice vis-à-vis de *Leishmania infuntum*. L'IC50 varie de 10 à 25 µg/ml. L'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* mérite plus d'attention puisque à notre connaissance, c'est la première mention de l'activité leishmanicide de cette plante.

L'extrait de l'*Artemisia herba alba* a montré plus d'efficacité aussi bien sur des bactéries que des levures. Le pouvoir antimicrobien des extraits d'*Ajuga iva* et du *Marrubium vulgare* est moins important, en comparaison avec celui de l'*Artemisia herba alba*.

En perspectives, l'étude relation structure-activité permettra de corrélér les résultats des tests biologiques avec des structures bien précises responsables de l'activité. Cette étude est très importante si l'on veut améliorer l'effet biologique de ces composés. Ceci permettra dans le futur la synthèse de molécules potentiellement actives. L'étude *in vivo* viendra confirmer ou infirmer ces premiers résultats.

Finalement les études ethnobotaniques nous ont indiqué d'autres plantes potentiellement qui pourraient également faire l'objet d'une démarche exploratoire systématiquement similaire.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. **Ameenah G. F. (2006)**. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, **27**: 1-93.
2. **Bruneton J. (1999)**. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Editions Tec & Doc, Paris, 207-211.
3. **Emberger L. (1971)**. Travaux de botanique et d'écologie. Ed. Masson. 520 p.
4. **Israili Z.H. and Lyoussi B. (2009)**. Ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga*. *Pak J Pharm Sci*, **22**: 425-462.
5. **Halimi A.K. (2004)**. Les plantes médicinales en Algérie. Editions BERTI, Alger. 156-157.
6. **Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G. (1997)**. Antioxidant properties of phenolic Compounds. *Plant Sci*, **2**: 152-159.
7. **El Hilaly J., Lyoussi B., Wibo M. and Morel N. (2004)**. Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *J Ethnopharmacol*, **93**: 69-74.
8. **Wessner M., Champion B., Girault J.P., Kaouadji N., Saidi B. and Laffont R. (1992)**. Ecdysteroids from *Ajuga iva*. *Phytochemistry*, **31**: 3785-3788.
9. **Ziyyat A., Legssyer A., Mekhfi H., Dassouli A., Serhrouchni M. and Benjelloun W. (1997)**. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Moroccan. *J Ethnopharmacol*, **58**: 45-54.
10. **Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J. and Younos C. (1991)**. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *J Ethnopharmacol*, **35**: 123-143.
11. **Baba Aissa F. (1999)**. Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Edition librairie modern-Rouiba. Alger.
12. **Taleb-Senoucia D., Ghomaria H., Kroufa D., Bouderbala S., Prost J., Lacaille-Duboisc M.A. and Bouchenaka M. (2009)**. Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, **16**: 623-631.
13. **El-hilaly J., Tahraoui T., Israili Z.H. and Lyoussi B. (2007)**. Acute hypoglycemic, hypocholesterolemic and hypotriglyceridemic effects of continuous intravenous infusion of a lyophilised aqueous extract of *Ajuga Iva* L. Schreber whole plant in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pak J Pharm Sci*, **20** : 261-268.

14. **El-hilaly J., Tahraoui T., Israili Z.H. and Lyoussi B. (2006).** Hypolipidemic effects of acute and sub-chronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L. whole plant in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol* **105** : 441–448.
15. **Nikolova M., Gussev C.H. and Nguyen T. (2010).** Evaluation of the Antioxidant action and flavonoid composition of *Artemisia* species extracts. *Biotechnol*, 21-23.
16. **Quezel P. and Santa S. (1962).** Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, Tome I. 565 p.
17. **Marco J.A. (1989).** Sesquiterpene lactones from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*, **28**: 3121-3126.
18. **Saleh N.A.M., El-Negoumy S.I. and Abou-Zaid M.M. (1987).** Flavonoids of *Artemisia judaica*, *A. monosperma* and *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*, **26**: 3059–3064.
19. **Salah S.M. and Jager A.K. (2005).** Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol*, **97**: 145–149.
20. **Mohamed H., El-Sayed M.A., Hegazy M.E., Helaly S.E., Esmail A.M. and Mohamed N.S. (2010).** Chemical Constituents and Biological Activities of *Artemisia herba-alba*. *Rec Nat Prod*, **4**: 1-25.
21. **Ghrabi Z. and Sand R.L. (2008).** *Artemisia herba alba* Asso. A Guide to Medicinal Plants in North Africa, 49 - 49.
22. **Tastekin D., Atasever M., Adigüzel G., Keles M. and Tastekin A. (2006).** Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba-alba* in experimental hyperglycaemic rats. *Bull Vet Inst Pulawy*, **50**: 235-238.
23. **Hatimi S., Boudouma M., Bichichi M., Chaib N. and Guessous Idrissi N. (2001).** *B Soc Pathol*, **94**: 29-31.
24. **Yin Y., Gong F.Y., XinWu X., Sun Y., Li Y., Chen T. and Xu Q. (2008).** Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *J Ethnopharmacol*, **120**: 1–6.
25. **Boudjelal A., Henchiri C., Siracusa L., Sari M. and Ruberto G. (2012).** Compositional analysis and in vivo antidiabetic Activity of Wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia* **83**: 286–292.
26. **Çitoğlu G.S. and Aksit F. (2002).** Occurrence of marrubiin and ladanein in *Marrubium trachyticum* Boiss. from Turkey. *Biochem Syst Ecol*, **30**:885–886.

27. **Nawwar M.A.M., El-Mousallamy A.M.D., Barakat H.H., Buddrus J. and Linscheid M. (1989).** Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, **28**: 3201–3206.
28. **Papoutis Z., Kassi E., Mitakou S., Aligiannis N., Tsiapara A. and Chrousos G.P. (2006).** Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *J. Steroid Biochem Mol Biol*, **98**: 63–71.
29. **Dellile L. (2007).** Les plantes médicinales d'Algérie.
30. **Masoodi M. H., Ahmed B., Zargar I. M., Khan S. A., Khan S. and Singh P. (2008).** Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *African J Biotechnol*, **7**: 86-87.
31. **Agence Nationale pour l'Aménagement du Territoire (A.N.A.T.). (2002).** Plan d'aménagement de la wilaya de M'sila. Tome 1 Alger : 4-9.
32. **Inspection de l'environnement. (2002).** Rapport sur l'état de l'environnement de la wilaya de M'sila.
33. **Rammade F. (2003).** Eléments d'écologie (écologie fondamentale). 3^{ème} édition. Paris. 99p.
34. **<http://www.msila-dz.org>. Site officiel de la wilaya de M'Sila.**
35. **Station météorologique de M'sila (2007).**
36. **Benkheira A., Ouboussad S. et Bessah G. (2005).** Plan de gestion du site Mergueb. Wilaya de M'Sila. Direction générale des forêts : 86-88.
37. **Mehdiou R. et Kahouadji A. (2007).** Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène: cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie*, n°29 : 11-20.
38. **Ozenda P. (1983) :** Flore du Sahara septentrional. Ed CNRS, Paris, 486 p.
39. **Houghton P. J. and Raman A., 1998.** Laboratory hand book for fractionation of natural extracts. Chapman et Hall, Londres, Ed., 29-31.
40. **Singleton V. L., Ortofer R. and Lamuela-Raventos R. M. (1999)** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. In: Packer L. (Ed). *Methods in Enzymology*. Orlando. Academic Press. 152-178.
41. **Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S. et Khebri S. (2010).** Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*, **11** (1): 69-81.
42. **Matteucci E. and Giampietro O. (2008).** Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *J Ethnopharmacol*, **115**:163–172.

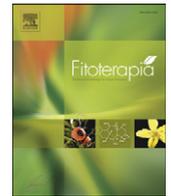
43. **Eidi A. and Eidi M. (2009).** Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, **3**: 40–44.
44. **Barham D. and Trinder P. (1972).** An improved color reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*, **97**:142–5.
45. **Rifai N., Bachorik P.S. and Albers J.J. (1999).** Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Comp; p. 809–61.
46. **Beutler E.(1984).** A manual of biochemical methods. In *Red Cell Metabolism*, 3rd ed:136.
47. **Koller, A. (1984).** Total serum protein. *Clin Chem*: 418.
48. **Murray R.L. (1984).** Transaminases. *Clin Chem*: 116.
49. **Kaplan A. (1984).** Urea. *Clin Chem*: 437.
50. **Tietz N.W. (1990).** *Clinical Guide to Laboratory Tests*, Second Edition W.B. Saunders Company, Philadelphia, 554-556.
51. **Matkowski A., Tasarz P. and Szypuła E. (2008).** Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2** (11): 321-330.
52. **Maataoui B.S., Hmyene A. and Hilali S. (2006).** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, **7**(1):3-8.
53. **Lopes-Lutz, D., Alviano S. D., Alviano C.S. and Kolodziejczyk P. P. (2008).** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, **69**:1732-1738.
54. **Harath Z. (2007).** Institut Pasteur Algérie.
55. **Sereno D. and Lemesre J. L. (1997).** Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41** (5): 972-976.
56. **Sereno D., Lemesre J. L. (1997).** Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigotes stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. *Parasitol Res*, **83**: 401-403.
57. **Odonne G., Bourdy G., Castillo D., Estevez Y., Lancha-Tangoa A., Castillo J.A., Deharo E., Rojas R., Stien D. and Sauvain M. (2009).** *Ta'ta', Huayani*: Perception of leishmaniasis and evaluation of medicinal plants used by the Chayahuita in Peru. Part II. *J Ethnopharmacol* **126**:149–158.

58. Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T. and Baser K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, **100**: 553-559.
59. Warda K., Markouk M., Bekkouche K., Larhsini M., Abbad A., Romane A. and Bouskraoui M. (2009). Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumoniae*. *Afr J Pharmacy and Pharmacology*, **3(3)**: 101-104.
60. Cunningham A.B. (1996). Peuples, parc et plantes. Recommandations pour les zones à usages multiples et les alternatives de développement autour du parc national de Bwindi Impénétrable, Ouganda. Documents de travail Peuples et Plantes n° 4. UNESCO, Paris, 66 p.
61. Hadj Salem J. (2009). Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. France.
62. Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*. **331**: 372-379.
63. Matkowski A., Tasarz P. and Szypuła E. (2008). Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *J. Med. Plants Res.* **2(11)**: 321-330.
64. Wu X., Beecher G. R., Holden J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt S. E. and Prior R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agricultural and Food Chem.* **52** : 4026–4037.
65. Sefi M., Fetoui H., Makni M. and Zeghal N. (2010). Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Food and Chem. Toxicol.* **48** : 1986–1993.
66. Sahpaz S., Garbacki N., Tits M., Bailleul F. (2002). Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J Ethnopharmacol*, **79**:389–92.
67. Nawwar M.A.M., El-Mousallamy A.M.D., Barakat H.H., Buddrus J. and Linscheid M. (1989). Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, **28**:3201–6.

68. **Deyama T., Kobayashi H., Nishibe S., Tu T. and Atta R. (2006).** Isolation, structure elucidation and bioactivities of phenylethanoid glycosides from Cistanche, Forsythia and Plantago plants. *Studies in Natural Products Chemistry – Bioactive Natural Products (Part M)*. The Netherlands: Elsevier B.V. Amsterdam, **33** : 645–74.
69. **Gálvez M., Martín-Corder M. and Ayuso M.J. (2006).** Pharmacological activities of phenylpropanoids glycosides. *Studies in Natural Products Chemistry – Bioactive Natural Products (Part M)*. The Netherlands: Elsevier B.V. Amsterdam, **33**: 675–718.
70. **Duke J.A. (1992).** *Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.
71. **Ghedira K., Chemli R., Richard B., Zeches M. and Le-Men-Olivier L. (1991).** Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle de Tunisie: étude des parties aériennes d'*Ajuga iva* (L.) Schreb. *Plantes Medicinales et Phytotherapie* **25** : 100-111.
72. **Novaes A.P., Rossi C., Poffo C., Pretti E.J., Oliveira E.A. and Schlemper V. (2001).** Preliminary evaluation of effect of some Brazilian medicinal plants. *Therapie*, **56**:427–30.
73. **Bnouham M., Ziyayat A., Mekhfi A., Tahri A. and Legssyer A. (2006).** Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990–2000). *Int J Diabetes Metabol*, **14**:1–25.
74. **Jarald E., Balakrishnan J.S. and Chandra D.J. (2008).** Diabetes and herbal medicines. *Iranian J Pharmacol Therap*, **7**:97–106.
75. **Prabhakar P.K. and Doble M. A. (2008).** Target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants. *Curr Diabetes Rev*, **4**:291–308.
76. **Almadal, T.P. and Vilstrup, H. (1988).** Strict insulin treatment normalizes the organic nitrogen contents and the capacity of urea–N synthesis in experimental diabetes in rats *Diabetologica*; **31**:114-118.
77. **Hamdy A. M., Al-Sayeda A. N., Yousef M.I. and Sheweita S. A. (2002).** Biochemical study on the effects of some Egyptian herbs in alloxan-induced diabetic rats. *Toxicology* **170** : 221–228.
78. **Hamza N., Berke B., Cheze C., Agli A.N., Robinson P., Gin H. and Moore N. (2010).** Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. *J Ethnopharmacol*, **128**: 513–518.

- 79. Iriadam M., Musa D., Hatice G. and Baba F. (2006).** Effects of two Turkish medicinal plants *Artemisia herba-alba* and *Teucrium polium* on blood glucose levels and other biochemical parameters in rabbits. *Journal of Cell and Molecular Biology*, **5**: 19-24.
- 80. Liu Z., Li J., Zeng Z., Liu M and Wang M. (2007).**The antidiabetic effects of Cysteinyl Metformin, a newly synthesized agent, in alloxan- and streptozocin-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*.
- 81. El Hilaly J. and Lyoussi B. (2002).** Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, **80**: 109–113.
- 82. Chenni A., Ait Yahia D., Boukourt F. O., Prost P., Lacaille-Dubois M. A. and Bouchenak M. (2007).** Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *J Ethnopharmacol*, **109** : 207–213.
- 83. Bouderbala S., Lamri-Senhadj M., Prost J., Lacaille-Dubois M. A. and Bouchenak M. (2008).** Changes in antioxidant defense status in hypercholesterolemic rats treated with *Ajuga iva*. *Phytomedicine*, **15**: 453–461.
- 84. Abdel-Sattar E., Maesand L. and Salama M. M. (2010).** In Vitro Activities of Plant Extracts from Saudi Arabia against Malaria, Leishmaniasis, Sleeping Sickness and Chagas Disease. *Phytother. Res.* **24**: 1322–1328.
- 85. Al-Bakri A. and Afifi F.U. (2007).** Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J. Microbiol. Methods.* **68** : 19–25.
- 86. Ramezania, M. , Fazli-Bazzaza B.S., Saghafi-Khademb F. and Dabaghiana A. (2004).** Antimicrobial activity of four *Artemisia* species of Iran. *Fitoterapia.* **75** : 201–203.
- 87. Zouari S., Zouari N, Fakhfakh N, Bougatef A., Ayadi M. A. and Neffati M. (2010).** Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba alba* Asso. *J. of Med. Plants Res.* **4(10)** :871-880.

PUBLICATION



Compositional analysis and *in vivo* anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion

Amel Boudjelal ^{a,*}, Cherifa Henchiri ^b, Laura Siracusa ^c, Madani Sari ^a, Giuseppe Ruberto ^{c,**}

^a Faculté des Sciences, Département des Sciences de la Nature et de la Vie. Université de M'Sila, 28000 M'Sila, Algeria

^b Laboratoire de Biochimie Appliquée. Université Badji Mokhtar, 23000 Annaba, Algeria

^c Istituto del CNR di Chimica Biomolecolare, Via P. Gaifami, 18 95126 Catania, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2011

Accepted in revised form 24 October 2011

Available online 9 November 2011

Keywords:

Marrubium vulgare L.

Medicinal plant

Phenylpropanoid esters

Flavonoids

LC-UV-vis-DAD-ESI-MS

Anti-diabetic activity

ABSTRACT

Marrubium vulgare (Lamiaceae) is a plant traditionally used for the treatment of diabetes in Algeria. Compositional analysis of the aqueous infusion revealed the presence of fifteen metabolites, all belonging to the class of polyphenols. Particularly, seven flavonoids have been detected, together with 5-caffeoylquinic (chlorogenic) acid in small amounts; the extract is dominated by the presence of a series of complex molecules, characterized as verbascoside (acteoside) derivatives. Concerning the anti-diabetic effectiveness a series of *in vivo* experiments were carried out on albinos Wistar rats. Diabetes was induced in the animals by intraperitoneal injection of alloxane; they were treated twice a day with aqueous extract from aerial part infusion (100, 200 and 300 mg/kg body weight) and glibenclamide (5 mg/kg body weight) for 15 days. Oral administration of 200 and 300 mg/kg body weight of aqueous extract the *Marrubium vulgare* induced a significant effect antidiabetic and antihyperlipidemic (dose-dependent effect). A decrease in blood glucose by 50% for the dose 100 mg/kg and more than 60% for doses 200 and 300 mg/kg, as well as a significant lowering of total lipids, triglycerides, and total cholesterol levels in treated animals, compared with diabetic controls group ($p < 0.001$), have been observed. Glibenclamide was used as reference and showed similar effects.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The sustainable management of traditional medicinal plant resources remains an important aspect of the development of new drug formulations, being past and recent history of drug discovery inexorably bound to plant kingdom [1–5]. Indeed, traditional medicine experience is precious in identifying possible target plant species or particular parts of them, also suggesting which kind of extraction should be used. The *Marrubium* genus, commonly known as horehound or hoarhound, belongs to the Lamiaceae family and counts more than 30 different species of flowering native to temperate

regions of Europe, northern Africa and Asia [6]. Nowadays, in the north of Africa (Algeria, M'Sila region) *Marrubium* plants are used in folk medicine as expectorants and for their antispasmodic properties, in acute or chronic bronchitis, coughs, asthma and in general for respiratory infections; they are also used in cases of lack of appetite and dyspepsia. Particularly, *M. vulgare* (white horehound or common horehound), locally named “Marriout”, is the most representative among the *Marrubium* species, being widely distributed in the area of M'Sila. It is currently used by traditional healers, alone or combined with other herbs such as elecampane (*Inula helenium* L.) and licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) to treat bronchitis, coughs and colds. The leaves and young flowering stems are used as antiseptic, antispasmodic, anti-diabetic, diuretic, strongly expectorant and tonic [7]. Many of the activities traditionally ascribed to *M. vulgare* were confirmed by intensive modern research and clinical trials, such

* Corresponding author. Tel.: +213 550983001; fax: +213 35555351.

** Corresponding author. Tel.: +39 0957338347; fax: +39 0957338310.

E-mail addresses: aboudjelal2003@yahoo.fr (A. Boudjelal), giuseppe.ruberto@icb.cnr.it (G. Ruberto).

as antioxidant [8], analgesic [9], anti-inflammatory [10], and anti-oedematogenic [11]; furthermore, extracts of this plant have shown some effects on type-II diabetes [12] and, very recently, on neurological disorders [13]. Extracts coming from plants belonging to the *Marrubium* genus have shown a very complex metabolic pattern, containing, among other secondary metabolites, diterpenes [14,15], flavonoids [14,16], and a series of phenyl propanoids esters, together with their derivatives [10,17]. Particularly, the diterpene lactone marrubiin can be considered as a chemotaxonomic marker for this species, as its occurrence is practically ubiquitous along the different varieties of plants; marrubiin is also considered the molecule responsible for the majority of the biological properties ascribed to the *Marrubium* ssp. and particularly to *M. vulgare*. Apigenin and luteolin are definitely the most common flavonoids present in the species, which is a peculiar characteristic of the Lamiaceae family; moreover, uncommon derivatives such as lactates can be found in the plant extracts [16]. Another chemotaxonomic marker, ladanein (6-hydroxyapigenin-7,4'-dimethylether) has been found in *Marrubium* species, as well as from the closely related genus *Ballota* [14,18,19]. The *Marrubium* species also contain several complex phenylpropanoid esters, the simplest of which being the glycoside derivative acteoside (or verbascoside). Several acteoside derivatives have been found in *M. vulgare*: forsytoside, arenarioside, ballotetraside, alyssonoid, etc [10].

Here we report for the first time the complete metabolic composition of *M. vulgare* aqueous infusion, which was also successfully tested on type-II diabetes mellitus.

2. Experimental

2.1. General

Unless otherwise stated, all reagents and solvents were of analytical grade and used without further purification. Pure reference standards – chlorogenic acid, apigenin and luteolin – were purchased from Fluka; verbascoside was obtained from Extrasynthese (Lyon, France). HPLC solvent grade (water and acetonitrile) were from Carlo Erba, Milan, Italy.

2.2. Plant material and preparation of the extract

The plant, *Marrubium vulgare* (common horehound), was collected at the flowering stage in May 2009 in M'Sila (southern Algeria; longitude: 4°10', latitude 35°13' between 35°40' latitude Nord and 4°30' longitude East). The aerial parts of the plant were washed, dried at room temperature in the dark and then finely ground to a powder.

The aqueous extract was prepared according to the traditional method: 6 g of the grounded *M. vulgare* (see above) were dissolved in 25 ml of boiling distilled water; the hot infusion was then left to reach room temperature (ca. 15 min) and filtered. The filtrate was used as such for biological tests on animals.

For the analytical determinations, the aforementioned solution was evaporated in vacuum to give a brownish syrup as residue (0.72 g, 12% yield dry weight), which was kept at 4 °C under nitrogen atmosphere until use. Analytical solutions were made up immediately prior the analyses by solving an aliquot (30 mg) of the residue in 100 µL of HPLC grade water.

2.3. HPLC/UV-vis-DAD/ESI-MS and HPLC/UV-vis/DAD quantitative analyses

LC-UV-vis-DAD-MS experiments were performed on a Waters instrument equipped with a 1525 Binary HPLC pump, a Micromass ZQ with a ESI Z-spray source operating in negative mode, and a 996 Photo Diode Array Detector (DAD). Chromatographic runs were performed using reverse-phase column (Alltima C₁₈ totally end-capped, 250×4.6 mm, 5 µm particle size, Alltech, Italy). Polar extracts were analysed using solvent system B (acetonitrile) in solvent system A (2.5% formic acid in water) with the following gradient: 0 min: 5% B; 10 min: 15% B; 30 min: 25% B; 35 min: 30% B; 50 min: 90% B; then kept for 7 min at 100% B. The solvent flow rate was 1 mL/min, the temperature was kept at 25 °C with a column oven (Hitachi L-2300, VWR International, Milan, Italy), and the injector volume selected was 20 µL. DAD analyses were carried out in the range between 800 and 190 nm, setting the detector at 330 nm for cinnamic acids and 340 nm for flavonoids. Total ion current (TIC) chromatograms were acquired in negative mode, using a cone voltage of –20 V in the mass range between 1500 and 1800 *m/z* units. The other parameters used for the acquisition of the TICs were the following, capillary voltage: 2.75 kV; source temperature: 150 °C; desolvation temperature: 280 °C; gas flow (L/hr): 400 (desolvation) and 210 (cone). Collected data were processed through a Mass Lynx v. 4.00 software (Waters S.p.A. Milano, Italy). Quantification of *M. vulgare* metabolites was carried out on a Dionex instrument equipped with a P580 binary high pressure pump, a PDA-100 Photodiode Array detector, a TCC-100 Thermostatted Column Compartment and an ASI-100 Automated Sample Injector. Collected data were processed through a Chromeleon Chromatography Information Management System v. 6.70. Chromatographic runs were performed using the same experimental conditions (column, elution program and solvents) previously described. Quantification was carried out at 330 nm for chlorogenic acid and verbascoside derivatives using calibration curves established with chlorogenic acid and verbascoside (correlation coefficient $R_2=0.9992$ and $R_2=0.9998$, respectively); the same wavelength was used to quantify apigenin and its derivatives (apigenin as external standard, $R_2=0.9999$). Luteolin and related metabolites were quantified at 340 nm using luteolin itself to build up the calibration curve ($R_2=0.9999$). Analyses were carried out in triplicate.

2.4. Animals

Wistar strain albino rats (180–200 g) were purchased from Pasteur Institute of Algeria. They were acclimatized to animal house conditions. The animals were fed *ad libitum* with pellet diet (ONAB: national office of animal feed, Bejaia) and water. They were also kept and maintained under laboratory conditions of temperature and light (24±1 °C and 12 h light/dark cycle), respectively.

2.5. Diabetes induction

The rats were injected intra-peritoneally with a single injection of alloxan monohydrate (Sigma-Aldrich Co., USA) dissolved in sterile normal saline at a dose of 150 mg/kg body weight [20]. After 3 days, hyperglycaemia was confirmed by

Table 1Group division of *in vivo* experiments.

Group I	Normal control (rats treated with distilled water)
Group II	Diabetic control (rats treated with distilled water)
Group III	Diabetic rats treated with glibenclamide (5 mg/kg b.w.)
Groups IV–VI	Diabetic rats treated with <i>Marrubium vulgare</i> aqueous infusion (100, 200 and 300 mg/kg b.w., respectively)

using the Accu-Chek Active Glucometer (Roche Diagnostics, Germany). Only rats with fasting blood glucose levels greater than 300 mg/dl were selected and used in this study [21].

2.6. Experimental design

Rats were randomly divided into six groups Table 1, each group consisting of six animals. The drug preparations were given orally to rats of each group twice daily for 15 days.

2.7. Assessment of blood glucose level and weight before sacrifice

Blood was collected from the tail vein before extract administration every two days, for determination of blood glucose level using Accu-Chek Active Glucometer. The results were expressed in terms of milligram per deciliter of blood. The body weight was measured every five days.

2.8. Biochemical assay

At the end of the experiment (15 days), rats were fasted overnight and sacrificed. Blood samples were collected in tubes. Serum glucose, total lipids, triglycerides and total cholesterol levels were determined. Serum glucose was estimated by

oxidase method [22]. Total lipids, triglycerides and total cholesterol by the method of Rifai et al. [23].

2.9. Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SD. Within group comparisons were performed by analysis of variance using ANOVA test. Significant difference between control and experimental groups were assessed by the Student's *t*-test; *P*-values of less than 0.05 were considered to be significant.

3. Results and discussion

3.1. Qualitative and quantitative analysis of *M. vulgare* aqueous infusion

The combined use of LC with UV-vis-DAD and ESI-MS detectors is, by now, a powerful tool which allows through the acquisition of two independent sets of analytical data, namely UV-vis and mass spectra (MS), to obtain fundamental indications about the chemical nature of the components of complex chemical matrices such as an extract. A series of preliminary injections with a mixture of analytical standards allowed us to set up the experimental ESI-MS parameters; for instance, a “soft” cone voltage value (20 V), in order to obtain mass spectra with basic structural information (pseudomolecular ion and main fragments), has been applied. Complex cinnamic acids derivatives such as verbascoside (also known as acteoside), as well as luteolin and apigenin derivatives, can be more easily detected by setting the ESI probe in negative mode. The LC chromatogram (Fig. 1) from *M. vulgare* aqueous extract can be conveniently

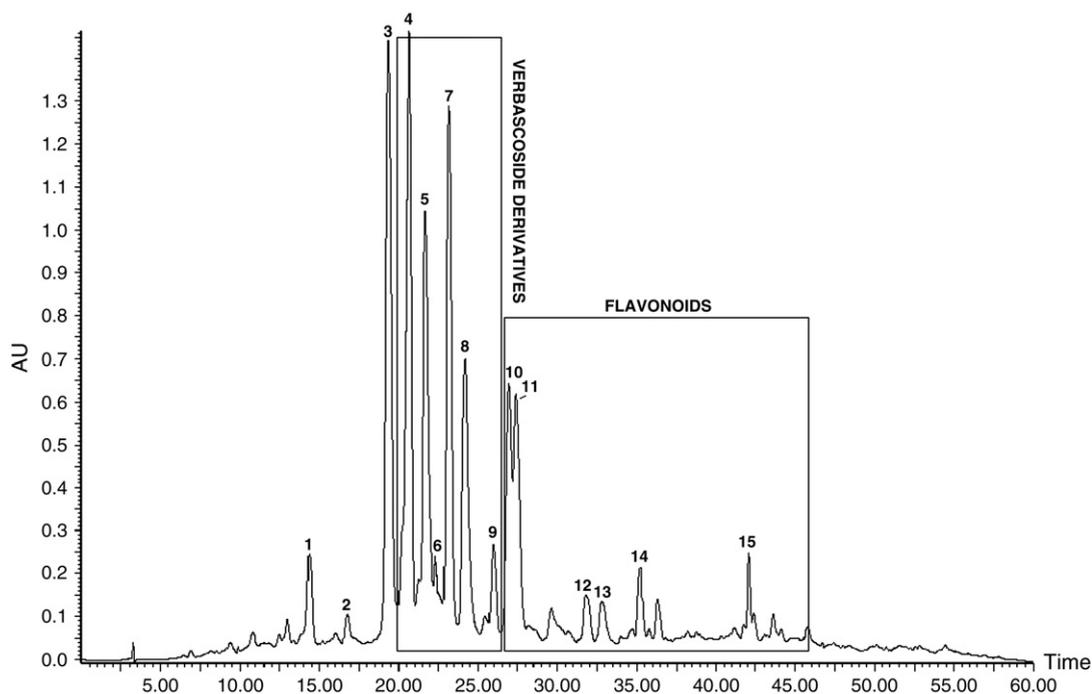


Fig. 1. LC chromatogram of *M. vulgare* aqueous extract, visualized at $\lambda = 330$ nm (peaks 4–9 are phenyl-propanoid esters as discussed in the text).

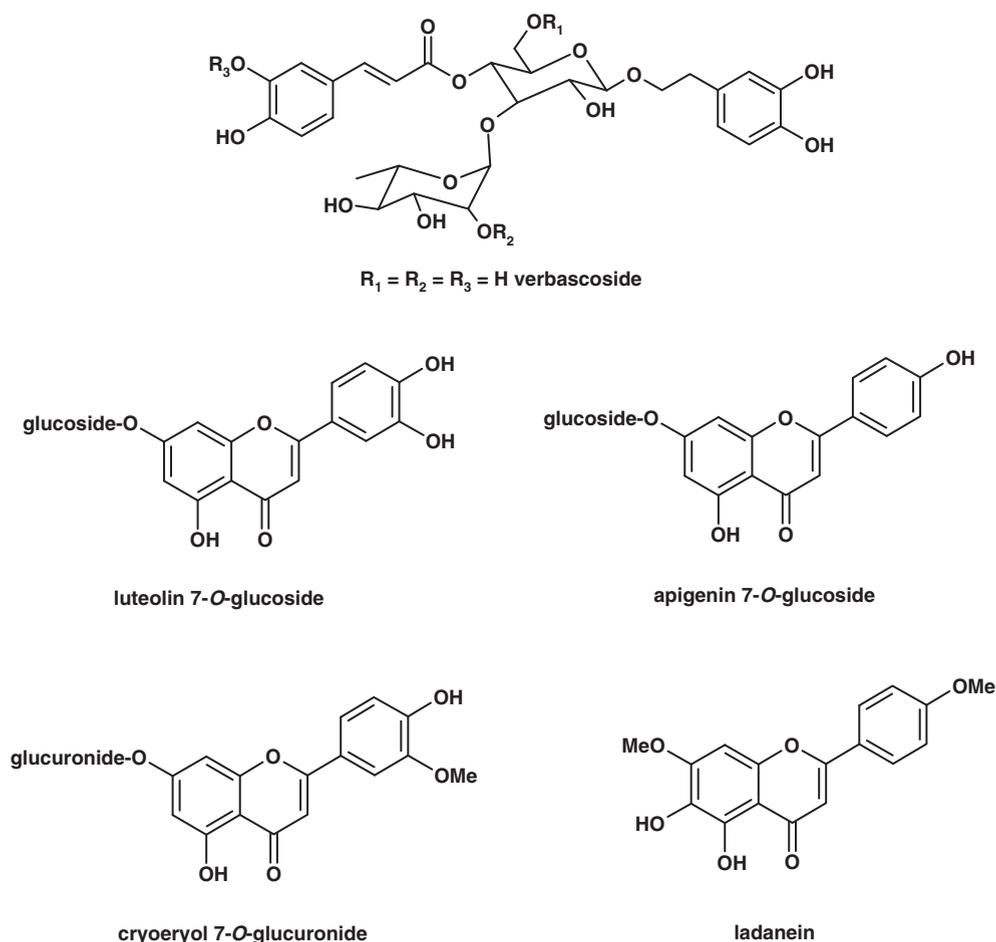


Fig. 2. Verbascoide (phenyl-propanoid ester) and flavonoids (below) from *M. vulgare*. These metabolites belong to the chemotaxonomic markers of this plant.

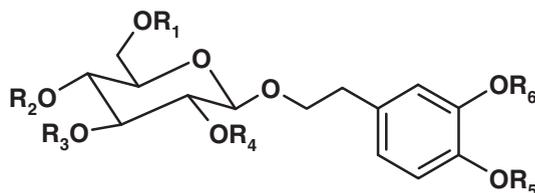
divided into two different parts: the first one, from 20.00 to 26.50 minutes is where verbascoside and its complex sugar derivatives elute, whilst glycosilated flavonoids appear in the range between 26.51 and 42.50 min (see also Supplementary material). Fig. 2 shows some selected structures of the aforementioned molecules. Data coming from the mass spectrometric analyses (pseudomolecular ion and main fragments mass values) were crucial to tentatively identify peaks 4–9 in Fig. 1 as verbascoside derivatives; in fact, from the m/z values of the corresponding pseudomolecular negative ions, we were able to address a molecular mass of 888 to peak 4, 756 to peak 5, 6 and 7, and finally a molecular mass of 770 to peak 9. The identity of peak 8 as verbascoside was confirmed by co-injection with the original standard, which was also helpful to compare the fragmentation patterns along this series. According to the data present in literature peaks 4 and 9 can be identified as ballotetrosside and alyssonoside, respectively (see Table 2). The three peaks (5–7), all with molecular mass of 756, on the other hand, correspond to at least four different isomeric metabolites (namely, angaroside, arenarioside, forsythoside B, lanvandulylfoliside) all found in *Marriubium* species and/or in its closely related genus *Ballota* [10,17]; unfortunately, with the only MS data in our hands, we can not exactly identify “which is which”.

Table 2

List of metabolites identified in *M. vulgare* aqueous infusion.

peak #	Rt (min)	Identification	mg/100 mg dry wt.
1	14.74	5-O-caffeoylquinic (chlorogenic) acid	0.67
2	17.21	apigenin 6,8 di-C-glucoside (vicenin-2)	0.42
3	20.05	N.I. ^a	1.88
4	21.17	ballotetrosside ^b	3.66
5	22.28	verbascoside-pentoside ^c	2.22
6	23.02	verbascoside-pentoside ^c	0.45
7	23.58	verbascoside-pentoside ^c	2.76
8	24.79	verbascoside ^d	1.78
9	26.37	alyssonoside ^b	0.67
10	27.04	luteolin O-glucoside	1.21
11	27.82	luteolin O-glucuronide	1.02
12	31.69	apigenin O-glucoside	0.62
13	33.08	apigenin O-glucuronide	0.65
14	35.37	crysoeriol O-glucuronide	0.69
15	41.89	ladanein	0.47
Total flavonoids			5.08
Total cinnamic acid derivatives (of which verbascosides)^e			14.09
			(11.54)

^a N.I. = verbascoside derivative not identified; ^b tentatively identified; ^c correct isomer not identified; ^d co-injection with high-purity standard, ^e peak 3 not included.



R₁ = H, caffeoyl, feruloyl, acetyl, apiose, xylose, rhamnose, glucose

R₂ = H, caffeoyl, feruloyl

R₃ = H, apiose, glucose, apiose, arabinose-rhamnose, rhamnose-apiose, glucose-rhamnose, apiose-rhamnose, xylose-rhamnose

R₄ = H, acetyl, apiose, glucose

R₅, R₆ = H, CH₃

Fig. 3. General molecular scheme of phenylethanoid glycosides (PhGs).

These components, which can be considered more specifically phenylethanoid glycosides (PhGs), are characterized by a phenyl ethyl, caffeoyl, feruloyl and acetyl acid groups, and a series of sugar isomer moieties (Fig. 3). This molecular complexity intrinsically implies a large number of isomers, further complicated by the presence of different mono- and poly-methoxy derivatives [24,25].

Finally, peak 3, on the basis of its mass spectral data (pseudomolecular ion and main fragmentations), is probably another verbascoside derivative. Anyhow, further analytical investigations by means of exhaustive spectroscopic methods are required for an unambiguous identification.

In the second half of the chromatogram, ranging from 26.51 to 42.50 min, seven main peaks elute, whose UV–vis and mass spectra are ascribable to several derivatives of the flavonoid luteolin and, mostly, apigenin. In fact, apigenin is present as glucoside and glucuronide (peak 12 and 13), furthermore, chrysoeriol (3'-methoxyapigenin) and ladanein (6-hydroxyapigenin-7,4'-dimethylether, peak 15) can be considered apigenin derivatives, without mentioning vicenin 2 (apigenin 6,8 di C-glucoside, peak 2), at retention time *ca* 16.50 (Fig. 1 and Table 2). Flavonoids chrysoeriol and ladanein, together with the aforementioned verbascoside derivatives, belong to the group of chemotaxonomic markers for this plant. Quantitatively, the phenylpropanoid ester group is indeed the most abundant in the whole extract, counting for *ca* 11.5 mg/100 mg versus the *ca* 5 mg/100 mg of the total flavonoid content (Table 2). We took off from the phenylpropanoid ester group the signal labelled as peak 3 (Fig. 1 and Table 2), whose structure remain still undisclosed.

3.2. Anti-diabetic activity: effects of the aqueous extract on fasting blood glucose

The effect of different doses of the aqueous extract of *M. vulgare* on blood glucose of normoglycaemic and alloxan-diabetic rats is shown in Table 3. The results showed that in the group of diabetic control, the blood glucose levels are 3–4 times higher than that of normal control group. A sharp decline in blood glucose level was observed from the 3th day after the treatment with three doses of *M. vulgare* extracts and glibenclamide. In particular, the highest percentage decrease of glycaemia levels have been observed for the treatments with 300 mg/kg b.w. of *Marrubium* infusion (–62.55%) and the positive control (–65.90%). These results show the high effectiveness in lowering the blood glucose levels of *M. vulgare* infusion, confirming that this medicinal plant can be considered a powerful agent in the treatment of diabetes mellitus [26]. Moreover, during the past few years some of the new bioactive drugs isolated from hypoglycaemic plants such as *Marrubium vulgare* showed antidiabetic activity with more efficacy than oral hypoglycaemic agents used in clinical therapy [27]. This antidiabetic activity is then to be ascribed to the chemical components here discussed, whose mechanism could be a stimulation of insulin secretion from beta cells of islets or/and inhibition of insulin degradation processes [28].

3.3. Effects of the aqueous extract on body weight

The results listed in Table 4 exhibit the changes of body weight among diabetic and normal rats. A normal body weight gain was observed in group I, III, IV, V and VI, whereas

Table 3

Variation in blood glucose level overnight fast, after oral administration of aqueous extracts of *M. vulgare* for 13 days.

Group	Dose (mg/kg)	Blood glucose (mean ± SD) (mg/dL) Number of days							% decrease glycaemia ^c
		1	3	5	7	9	11	13	
Normal control	–	100.00 ± 0.89	99.83 ± 0.75	98.83 ± 0.75	98.16 ± 0.75	100.50 ± 1.05	99.66 ± 0.81	99.16 ± 0.75	0.84
Diabetic control	–	301.33 ± 1.21 ^a	345.17 ± 1.17 ^a	398.00 ± 1.47 ^a	414.83 ± 0.75 ^a	445.17 ± 0.75 ^a	472.33 ± 1.03 ^a	484.33 ± 0.82 ^a	(+) 60.73
Glibenclamide	5	379.83 ± 1.17	332.83 ± 1.72	286.17 ± 1.47 ^b	225.17 ± 1.17 ^b	179.17 ± 1.33 ^b	149.17 ± 0.75 ^b	129.50 ± 1.05 ^b	(–) 65.90
<i>M. vulgare</i>	100	387.50 ± 1.05	360.50 ± 1.05	301.15 ± 1.05 ^b	287.00 ± 0.89 ^b	247.17 ± 0.98 ^b	229.67 ± 1.21 ^b	190.83 ± 0.98 ^b	(–) 50.75
	200	320.17 ± 1.33	283.00 ± 0.89	211.00 ± 0.89 ^b	171.33 ± 1.21 ^b	146.83 ± 0.98 ^b	130.17 ± 1.17 ^b	124.67 ± 1.21 ^b	(–) 61.06
	300	381.00 ± 0.89	360.67 ± 0.82	288.00 ± 0.89 ^b	198.33 ± 0.82 ^b	163.50 ± 1.38 ^b	155.33 ± 1.21 ^b	142.67 ± 1.21 ^b	(–) 62.55

^aP < 0.001 when normal control compared to diabetic control; ^bP < 0.001 when treated diabetic groups compared to diabetic control; ^c % decrease glycaemia = [(final glycaemia – initial glycaemia) / initial glycaemia] × 100, (+): indicates a increase in blood glucose, (–): indicates a decrease in blood glucose.

Table 4
Effect of aqueous extract of *M. vulgare* on body weight after induction of diabetes.

Group	Dose (mg/kg)	body weight (g)			
		Number of days			
		1	5	10	15
Normal control	–	182.83 ± 0.98	188.67 ± 1.75	190.33 ± 2.66	197.50 ± 1.64
Diabetic control	–	199.33 ± 0.82	190.83 ± 1.47	184.83 ± 1.72	174.33 ± 1.37
Glibenclamide	5	189.33 ± 1.63	186.83 ± 1.94	189.83 ± 1.83	192.67 ± 1.97
<i>M. vulgare</i>	100	195.83 ± 1.47	192.50 ± 2.07	196.67 ± 1.75	200.33 ± 1.21
	200	197.00 ± 1.79	195.17 ± 0.75	201.17 ± 2.14	204.17 ± 1.47
	300	198.33 ± 1.03	197.17 ± 1.60	200.50 ± 1.87	204.33 ± 1.75

^a Values are means ± SD (n = 6).

Table 5
Variation in blood glucose and biochemical parameters after sacrifice.

Groups	Dose (mg/kg)	Parameters (mean ± SD) (mg/dL)			
		Glucose	Total lipids	Triglycerides	Total cholesterol
Normal control	–	100.33 ± 0.82	381.51 ± 4.30	88.42 ± 1.88	77.39 ± 1.02
Diabetic control	–	498.17 ± 0.75 ^a	778.44 ± 6.49 ^a	154.62 ± 4.56 ^a	176.29 ± 3.26 ^a
Glibenclamide	5	120.67 ± 1.21 ^b	469.60 ± 4.66 ^b	103.01 ± 1.19 ^b	125.37 ± 1.75 ^b
<i>M. vulgare</i>	100	187.33 ± 0.82 ^b	489.50 ± 5.69 ^b	129.33 ± 1.55 ^b	97.63 ± 1.25 ^b
	200	115.33 ± 0.79 ^b	398.24 ± 4.98 ^b	102.76 ± 1.39 ^b	79.21 ± 1.10 ^b
	300	136.00 ± 0.89 ^b	490.70 ± 4.14 ^b	100.89 ± 1.44 ^b	110.30 ± 1.69 ^b

^aP < 0.001 when normal control compared to diabetic control ; ^bP < 0.001 when treated diabetic groups compared to diabetic control.

a significant decrease of body weight gain was observed with the diabetic control group because during diabetes, this decrease in weight is due to enhanced catabolic processes such as glycogenolysis, lipolysis and proteolysis [29]. The treated diabetic group showed sign of recovery in body weight. On the contrary, the diabetic untreated group showed a progressive fall in body weight throughout the experimental period.

3.4. Effects of aqueous extract on biochemical parameters

Table 5 showed the levels of serum glucose, total lipids, triglycerides and total cholesterol of normal and experimental animals. There was a significant elevation in all biochemical parameters in the diabetic animals as compared with non-diabetic control group. The effect of administration of marrubium extract at 100, 200, 300 mg/kg b. w. and glibenclamide tended to decrease glycaemia, total lipids, triglycerides and total cholesterol without attaining the values of the normal control. The effect of aqueous extract was similar to that observed with the positive control, glibenclamide.

4. Conclusions

The present study was designed to evaluate the potential and the mechanisms of the antidiabetic activity of *M. vulgare* aqueous extract in alloxan-induced diabetic rats. Alloxan induces a specific necrosis of pancreatic islets when it is administered parenterally: intravenously, intraperitoneally, or subcutaneously [20].

M. vulgare has a long tradition in the control of diabetes in Algeria and other country [30,31], however, there are a few scientific reports dealing with the relationship of the

antidiabetic potential of the aqueous extract of this plant and its chemical composition [12,28]. Our results have shown the richness of the aqueous extract, firstly due to the presence of metabolites belonging mainly to the class of polyphenols, particularly flavonoids and secondly, a series of metabolites identified as verbascoside derivatives.

The antidiabetic study indicates that administration of the aqueous extract at 200 and 300 mg/kg/ twice daily for 2 weeks showed the best decrease in the blood glucose level of the alloxan diabetic rats comparable to the effects of the drug (glibenclamide). These results seem to confirm the rational bases for its use in traditional medicine.

The richness of the aqueous extract of *M. vulgare* in flavonoids and verbascoside derivatives, known in the literature as antidiabetic agents, could be the origin of the observed effects [16]. Further studies will be focused on a more rational use in traditional medicine of this plant.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.fitote.2011.11.005.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNEPRU/F05620080010 (Algeria) and Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR - Rome, Italy) for financial support. Thanks are also due to Mrs. Tonia Strano (ICB-CNR, Catania) for her skilful technical assistance and Djamel Sarri (M'Sila University, Algeria) for the plant identification.

References

- [1] Tyler VE. Phytomedicine: back to the future. *J Nat Prod* 1999;62:1589–92.
- [2] Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci* 2005;78:431–41.

- [3] Dixon RA. Engineering of plant natural product pathways. *Curr Opin Plant Biol* 2005;8:329–36.
- [4] Nakanishi K. Studies in microbial and insect natural product chemistry. *J Nat Med* 2006;60:2–20.
- [5] Baker DD, Chu M, Oza U, Rajgarhia V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat Prod Rep* 2007;24:1225–44.
- [6] Argyropoulou C, Karioti A, Skaltsa H. Labdane diterpenes from *Marrubium thessalum*. *Photochemistry* 2009;70:635–40.
- [7] Delile L. Les plantes médicinales d'Algérie. Alger: Berti; 2007.
- [8] Berrougui H, Isabelle M, Cherki M, Khalil A. *Marrubium vulgare* extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage. *Life Sci* 2006;80:105–12.
- [9] Meyre-Silva C, Yunes RA, Schlemper V, Campos-Buzzi F, Cechinel-Filho V. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). *Il Farmaco* 2005;60:321–6.
- [10] Sahpaz S, Garbacki N, Tits M, Bailleul F. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J Ethnopharmacol* 2002;79:389–92.
- [11] Stulzer HK, Tagliari MP, Zampirolo JA, Cechinel-Filho V, Schlemper V. Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *J Ethnopharmacol* 2006;108:379–84.
- [12] Herrera-Arellano A, Aguilar-Santamaría L, García-Hernández B, Nicasio-Torres P, Tortoriello J. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine* 2004;11:561–6.
- [13] Erdogan Orhan I, Belhattach R, Şenol FS, Gülpinar AR, Hoşbaş S, Kartal M. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Ind Crops Prod* 2010;32:566–71.
- [14] Çitoğlu GS, Aksit F. Occurrence of marrubiin and ladanein in *Marrubium trachyticum* Boiss. from Turkey. *Biochem Syst Ecol* 2002;30:885–6.
- [15] Rodrigues CA, Savi AOS, Schlemper V, Reynaud F, Cechinel-Filho V. An improved extraction of marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Chromatographia* 1998;47:449–50.
- [16] Nawwar MAM, El-Mousallamy AMD, Barakat HH, Buddrus J, Linscheid M. Flavanoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry* 1989;28:3201–6.
- [17] Papoutis Z, Kassi E, Mitakou S, Aligiannis N, Tsiapara A, Chrousos GP, et al. Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;98:63–71.
- [18] Tóth E, Tóth G, Máthé I, Blunden G. Martynoside, forsythoside B, ladanein and 7a-acetoxyrolyenone from *Ballota nigra* L. *Biochem Syst Ecol* 2007;35:894–7.
- [19] Alkhatib R, Jaha S, Cheok M, Roumy V, Idziorek T, Preudhomme C, et al. Activity of ladanein on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare*. *Planta Med* 2010;76:86–7.
- [20] Matteucci E, Giampietro O. Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *J Ethnopharmacol* 2008;115:163–72.
- [21] Eidi A, Maryam E. Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Metab Syndr - Clin Res Rev* 2009;3:40–4.
- [22] Barham D, Trinder P. An improved color reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 1972;97:142–5.
- [23] Rifai N, Bachorik PS, Albers JJ. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Comp; 1999. p. 809–61.
- [24] Deyama T, Kobayashi H, Nishibe S, Tu T, Atta-ur-Rahman. Isolation, structure elucidation and bioactivities of phenylethanoid glycosides from *Cistanche*, *Forsythia* and *Plantago* plants. *Studies in Natural Products Chemistry – Bioactive Natural Products (Part M)*, Vol. 33. The Netherlands: Elsevier B.V. Amsterdam; 2006. p. 645–74.
- [25] Gálvez M, Martín-Corder M, Ayuso MJ. Pharmacological activities of phenylpropanoids glycosides. In: Atta-ur-Rahman, editor. *Studies in Natural Products Chemistry – Bioactive Natural Products (Part M)*, Vol. 33. The Netherlands: Elsevier B.V. Amsterdam; 2006. p. 675–718.
- [26] Novaes AP, Rossi C, Poffo C, Pretti EJ, Oliveira EA, Schlemper V, et al. Preliminary evaluation of effect of some Brazilian medicinal plants. *Therapie* 2001;56:427–30.
- [27] Bnouham M, Ziyat A, Mekhfi A, Tahri A, Legssyer A. Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990–2000). *Int J Diabetes Metabol* 2006;14:1–25.
- [28] Jarald E, Balakrishnan JS, Chandra DJ. Diabetes and herbal medicines. *Iranian J Pharmacol Therap* 2008;7:97–106.
- [29] Prabhakar PK, Doble M. A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants. *Curr Diabetes Rev* 2008;4:291–308.
- [30] Tahraoui A, El-Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *J Ethnopharmacol* 2007;110:105–17.
- [31] Zyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J Ethnopharmacol* 1997;58:45–54.