



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire
قسم: الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزئية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Étude phytochimique et évaluation *in vitro* des activités antioxydante, antidiabétique, antifongique et antibactérienne d'extrait de la plante *Ginkgo biloba* L.

Présenté par : AYADI Ikram

Le : 25/06/2025

ADOUI Ikram

Jury d'évaluation :

Président : KHEDARA A. (MC(A)- UConstantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : LAID EP BOUANIMBA N. (MC(A)-UConstantine 1 Frères Mentouri).

Examinateur(s) : BOUDERSA N. (MC(B)- UConstantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire 2024-2025

Remerciement

*Avant tout, nous remercions **Dieu** Tout-puissant qui nous a accordé la force et l'opportunité d'achever ce modeste travail.*

*Nous adressons nos sincère remerciements à **Mme LAID EP BOUANIMBA N.** maître de conférences classe "A" à l'université Mentouri Constantine, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils qui ont contribué pour la réalisation de ce mémoire.*

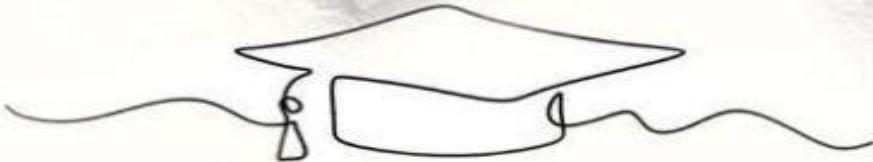
*Nous Tenons à remercier **Dr KHEDARA A.** Professeur à l'université des frères Mentouri, de l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de présider notre jury.*

*Nous remercions également **Dr BOUDERSA N.** maître de conférences classe "B" à l'université des frères Mentouri d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Par cette même occasion, nous remercions monsieur **BENSOUICI Chawki** chef de laboratoire de contrôle de qualité au centre de recherche en biotechnologie et monsieur **BOUMELA Houcine** chef de laboratoire de biochimie à l'université frères Mentouri Constantine.*

*Un grand merci également à tous ceux qui ont participé à la réussite de ce mémoire : Dr **BEZI Tarek**, Dr **TOUMI Mohammed ES Seddik**, Mr **Ibrahim ElKhalil**, ainsi que l'ingénieur du laboratoire du biochimie, Mm **ZAHRAOUI Chafika**.*

Dédicaces



بِاسْمِ اللَّهِمَ أَبْدَأْ، وَبِحَمْدِكَ أَسْتَفْتَحْ هَذِهِ الصَّفَحَاتِ، فَأَنْتَ صَاحِبُ الْفَضْلِ أَوْلَأَ وَآخِرًا،

وَمِنْكَ التَّيسِيرُ وَالتَّوْفِيقُ فَلَكَ الشُّكْرُ وَالثَّنَاءُ دَائِمًا وَأَبَدًا

À moi-même, Même si ce n'était pas mon rêve, j'ai avancé avec patience et engagement. Je me dédie ce travail, en reconnaissance de mes efforts, et du chemin parcouru malgré tout.

À ceux que j'aime plus que tout, à ceux qui ont éclairé mon chemin vers la connaissance, à ceux qui se sont privés pour me donner.

*À ceux sur qui je me suis appuyé dans ma fatigue et ma tristesse, à celui dont je porte le nom avec fierté, **mon cher père Amar**, que Dieu prolonge sa vie.*

*À celle qui m'a soutenue par ses prières et ses bénédictions, à celle qui a illuminé mon chemin, à la grande femme qui veillait les nuits, à la signification même de l'amour et de la tendresse, **ma chère mère Malika**.*

*À **Sana, Lamia et Abdelkader**, Vous êtes bien plus que mes frères et sœurs : vous êtes ma force, ma bénédiction et le vrai sens de la famille. Votre amour et votre soutien illuminent ma vie.*

*À notre petit trésor **Mohamed**, Tu es la joie de notre vie, notre plus précieux bonheur. Que Dieu te protège, toi, le plus beau des cadeaux.*

*À ma chère binôme **Ikram**, Merci pour votre soutien et votre bienveillance. Votre présence a été déterminante à chaque étape. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.*

*À mes chers **amis**, Votre présence a embelli ma vie de sincérité et de chaleur. Merci pour chaque instant partagé. J'espère vous garder toujours à mes côtés.*

*À **la Palestine**, Toi, le souffle de la dignité dans un monde brisé. Ta terre bénie habite nos âmes, et ton histoire vit dans nos consciences. Nous n'oublierons jamais, et nous ne trahirons pas... Pour toi, nos prières, notre nostalgie, et la promesse de rester fidèles, toujours.*

Adoui ikram.

Dédicace

{بِرَفْعِ اللَّهِ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أَوْتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ}

الحمد لله حبا وشكرا وامتنانا... ما كنت أفعل هذا لو لا فضل الله فالحمد لله على البداء وعلى الخاتم

*Je dédie ce succès d'abord **À moi-même**, la fierté de cet accomplissement et la couronne de tous ces efforts... Ce travail est le fruit de ma patience et de ma persévérance...*

*À la lumière qui a illuminé mon chemin, à ce cher dont je porte le nom avec fierté, à l'homme qui a toujours œuvré pour que je sois la meilleure, mon **cher père "Ibrahim"**... et tu as toujours cru en moi, même lorsque je doutais.*

*À celle qui fut l'étreinte chaleureuse et la prière sincère, à celle qui a veillé des nuits entières pour moi, à ma chère mère **"Nadia"**, merci pour ta présence constante à chaque étape de ma vie.*

*À mon amie **"Adoui Ikram"** qui m'a aidé dans ce travail et a contribué à sa réalisation par sa persévérance et son soutien sincère... Merci d'être à mes côtés.*

*À ma grand-mère, mon grand-père, mes tantes **"Halima&Hamama"**, ma cousine **"Bouchra"** et la femme de mon oncle, merci pour vos prières, votre amour et votre confiance... Cette réussite vous appartient autant qu'à moi.*

À mes amis avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, mes compagnons de route et mes souvenirs, merci pour tout votre soutien et pour chaque geste sincère.

À ceux qui ont traversé ma vie, mais qui ont laissé une empreinte inoubliable... Merci pour les moments qui ont fait la différence.

من قال "أنا لها" نالها،
وأنا لها وإن أبْتَ رعْمًا عنْها أتَيْتُ بِهَا...



AYADI IKRAM.

Liste des abréviations**Liste des figures****Liste des tableaux****Introduction générale.....01*****SOMMAIRE*****Chapitre 01 : Etude Bibliographique**

I. Etude botanique sur la plante.....03
1.Définition03
2. Distribution de <i>Ginkgo biloba</i>03
3. Description botanique04
3.1. Classification systématique.....05
3.2. Les souches mâles et femelles.....05
3.3. L'écorce.....05
3.4. Les feuilles.....05
3.5. Les fruits.....06
3.6. Les Fleurs.....06
4. Les composés chimiques07
4.1. Les flavonoïdes.....07
4.1.1. Définition.....07
4.1.2. Les structures chimiques.....07
4.2. Les terpénoïdes.....08
4.2.1. Les ginkgolides.....08
4.2.2. Le Bilobalide.....09
4.3. Autres composés.....10
5. Propriétés pharmacologique.....10
6. Effets indésirables11
7. Les travaux antérieurs sur l'espèce <i>G.biloba</i> L.....12
II. Les activités biologiques14
II.1. Activité antioxydante14
1.1. Le stress oxydatif14

1.2. Les radicaux libres.....	14
1.2.1. Définition.....	14
1.2.2. Origine des radicaux libres.....	15
1.2.3. Types des radicaux libres.....	15
A. Espèce réactive de l'oxygène.....	15
B. Espèces réactives de l'azote (ERN).....	16
1.3. Défense Antioxydant.....	17
1.3.1. Les types d'antioxydants.....	17
1)Système endogène.....	17
A. Antioxydant enzymatique.....	17
B. Antioxydant non enzymatique.....	18
2)Système exogène.....	19
1.4. Mécanisme d'action des flavonoïdes dans l'activité antioxydante.....	21
A. Piégeage des radicaux libres.....	21
B. Inhibition enzymes.....	22
C. Chélation des ions métalliques.....	22
1.5. Les effets du stress oxydatif.....	23
A. Oxydation des lipides.....	23
B. Oxydation des protéines.....	23
C. Oxydation de l'ADN.....	23
II.2. Activité Enzymatique	25
2.1. Activité antidiabétique.....	25
2.1.1. Le diabète (Définition).....	25
2.1.2. Enzyme alpha-amylase.....	25
A. Définition et l'origine.....	25
B. Structure et mécanisme d'action.....	26
II.3. Activité antibactérienne	27
II.4. Activité antifongique.....	27

Chapitre 02 : Méthodes et Matériels

1. Matériels	28
1.1. Plante étudiée.....	28
1.2. Equipements et réactifs chimiques.....	28
2. Méthodes	29
2.1. Méthode d'extraction	29
2.2. Préparation d'extrait Hydroalcoolique	30
A. Broyage.....	30
B. Extraction solide-liquide (Macération).....	30
2.3. Screening phytochimique.....	33
2.3.1. Test des phénols.....	33
2.3.2. Test des flavonoïdes.....	33
2.3.3. Test des tanins.....	33
2.3.4. Test des saponines.....	33
2.4. Analyse phytochimique quantitative.....	34
2.4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	34
2.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	35
2.5. Les activités biologiques in vitro	36
2.5.1. Évaluation de l'activité antioxydante.....	38
A. Le test du DPPH.....	38
B. Le test de l'ABTS.....	39
C. Le test de FRAP.....	41
2.5.2. Les activités enzymatiques.....	42
A. Évaluation de l'Activité Antidiabétique.....	42
2.5.3. Evaluation de l'activité antifongique.....	44
2.5.4. Activité Antibactérienne.....	46

Chapitre 03 : Résultats et Discussion

1-Screening phytochimique	48
2.Résultats des dosages des polyphénols et des flavonoïdes	49
2.1. Résultats de dosage des polyphénols	49

2.2. Résultats de dosage des flavonoïdes	50
3. Les activités antioxydantes	52
3.1. Activité antiradicalaire DPPH	52
3.2. Activité de piégeage du cation radical ABTS•+	54
3.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)	55
4. Activité Enzymatique	57
4.1. Evaluation de l'activité Antidiabétique	57
5. Evaluation de l'activité antifongique	59
6. Evaluation de l'activité Antibactérienne	61
Conclusion.....	65

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

A_{0,5}: Concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique).

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

Asp : Acide aspartique.

ATTC : American Type Culture Collection.

BB : Bilobalide.

°C : Degré Celsius

C : Carbone.

Ca²⁺ : Calcium.

CAT : Catalase.

CJK : Chine-Japon-Corée.

Cm : Centimètre.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CoQ : Coenzyme Q.

CRBt : Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine.

Cu : Cuivre.

DI : Diamètre.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DPPH : 2,2-diphényl picrylhydrazyl.

E. coli : Escherichia coli.

EHAGB : Extrait hydroalcoolique de Ginkgo biloba.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

EMGB : Extrait méthanolique de Ginkgo biloba.

Fe²⁺: Fer ferreux.

Fe³⁺ : Fer ferrique.

FeCl₃ : Chlorure ferrique.

FCR : Reactif Folin Ciocalteu.

Fl-O[•] : Radical flavonoxy

FRAP : Pouvoir antioxydant de la réduction ferrique.

FOL: Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici.

H: Hydrogène.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

IKI : Iodure de potassium.

GB: Ginkgo biloba.

GA: Ginkgolide A.

GABA: Acide gamma-aminobutyrique.

GB: Ginkgolide B.

GC: Ginkgolide C.

GPx: Glutathion peroxydase.

M : Moles par litre.

MeOH : Méthanol.

MDA : Malondialdéhyde.

mg : Milligramme.

µL : Microlitre.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre

mmol/l : Millimole par litre.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit.

nm : Nanomètre.

NO: Monoxyde d'azote.

NO₂ : Dioxyde d'azote.

O₂: Dioxygène.

O₂⁻: Anion superoxyde.

OH[·] : Radicaux hydroxyles.

PAF : Facteur d'activation des plaquettes.

pH : Potentiel hydrogène.

PDA : Potato Dextrose Agar.

RDL : Récepteurs résistant à la dieldrine.

RNS : Espèces réactives de l'azote.

ROS: Reactive oxygen species.

SOD: Superoxyde dismutase.

TTLs : Trilactones terpéniques.

Listes des Figures

Figure N°	Titre	Page
01	L'arbre de <i>Ginkgo biloba</i> .	3
02	Distribution géographique de <i>Ginkgo biloba</i> .	4
03	Feuille de <i>Ginkgo biloba</i> .	6
04	Fruits de <i>Ginkgo biloba</i> .	6
05	Les fleurs du <i>Ginkgo biloba</i> .	6
06	Formules développées des principaux glycosides flavonol présents dans <i>G. biloba</i> .	7
07	Classification des ginkgolides	9
08	Formules structurales du bilobalide	10
09	Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants	14
10	La formation d'un radical libre	15
11	Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène	18
12	Les trois états d'oxydation de la CoQ ₁₀	19
13	Structures chimiques des tocophérols qui composent la vitamine E et arrêt de la peroxydation lipidique par l'α-tocophérol.	20
14	Structure de vitamine C.	20
15	Piégeage des ROS (R•) par les flavonoïdes.	22
16	Sites de liaison pour les métaux traces.	23
17	Les fonctions des radicaux libres sur les biomolécules et leurs conséquences.	24

18	Action de l' α -Amylase sur le Poly- α -D-glucose : Hydrolyse en Maltose et Glucose.	25
19	Structure tridimensionnelle de l'alpha-amylase.	26
20	Les étapes de préparation du <i>Ginkgo biloba</i> pour l'extraction.	30
21	(A) : peser la plante dans la balance ;(B) : mélanger la poudre de la plante avec le solvant hydroalcoolique ;(C) : filtration de l'extrait ;(D) : extrait de macération.	31
22	Les étapes de séchage pour obtenir un extrait sec	31
23	Schéma récapitulatif du Protocole expérimentale.	32
24	Les différentes étapes suivies pour la préparation de l'échantillon.	37
25	Transformation du radical DPPH \bullet en DPPH.	38
26	Solution du DPPH.	39
27	Formation et piégeage du radical ABTS $^{+}$ par un antioxydant.	40
28	Réduction de fer (III) en fer (II).	41
29	Récapitulatif des différentes solutions préparées.	43
30	Préparation de milieux de culture PDA.	45
31	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	49
32	Evaluation des polyphénols totaux de l'extrait de <i>Ginkgo biloba</i> L.	50
33	Courbe d'étalonnage de la Quercétine	51
34	Evaluation des flavonoïdes totaux de l'extrait de <i>Ginkgo biloba</i>	51
35	Résultats du test DPPH sur microplaqué.	52

36	Valeurs CI ₅₀ du test DPPH.	53
37	Résultats du test ABTS sur microplaqué.	54
38	Valeurs CI ₅₀ du test ABTS.	55
39	Résultats du test FRAP sur microplaqué	55
40	Valeurs A _{0,5} du test FRAP.	56
41	Résultats de l'activité inhibitrice de l'alpha-amylase sur microplaqué.	58
42	Valeurs des CI ₅₀ du test d'inhibition de l'α-amylase pour l'extrait de <i>Ginkgo biloba</i> .	59
43	Taux d'inhibition des extraits de <i>Ginkgo biloba</i> sur <i>le Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> .	60
44	Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait hydroalcoolique (EHA7.5).	60
45	Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait hydroalcoolique (EHA12.5)	61
46	Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait hydroalcoolique (EHA30).	61
47	Inhibition bactérienne selon la concentration de l'extrait EHAGB.	63

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
01	Classification de l'espèce <i>Ginkgo biloba</i> L	5
02	Les travaux scientifiques sur le <i>Ginkgo Biloba</i> .	12
03	Les sources et l'origine des radicaux libres.	15
04	Les espèces réactives radicalaires et non radicalaire.	16
05	Les réactifs employés dans les diverses activités biologiques réalisées.	29
06	Les différentes concentrations des dilutions des extraits par rapport à la concentration initiale.	37
07	Les résultats du screening phytochimique de <i>Ginkgo biloba</i> L.	48
08	La teneur en composés phénoliques, flavonoïdes.	49
09	Inhibition du radical DPPH par l'extrait.	53
10	Inhibition du cation radical ABTS.	54
11	Réduction du fer par la méthode FRAP.	56
12	Inhibition de alpha-amylase par l'extrait de <i>Ginkgo biloba</i> .	58
13	Taux d'inhibition et diamètre moyen des thalles exposés à l'extrait Ginkgo biloba.	60
14	Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait sur les deux souches.	62

Introduction générale

Introduction générale

En thérapeutique, les plantes médicinales sont largement utilisées dans le monde entier, et ce malgré les avancées de la médecine moderne. Cette pratique ancienne suscite aujourd’hui un intérêt croissant auprès des populations. Les plantes constituent une source importante de molécules bioactives, appartenant généralement à la classe des métabolites secondaires. Dans ce contexte, l’Organisation Mondiale de la Santé encourage la recherche et l’utilisation des plantes médicinales, notamment dans les régions où l’accès aux soins médicaux modernes est difficile (**Niang et al., 2021**).

Les plantes produisent une grande diversité de composés organiques, généralement répartis en deux catégories : les métabolites primaires et les métabolites secondaires ; les métabolites primaires, essentiels à leur fonctionnement (la photosynthèse, la respiration, croissance) (**Crozier et al., 2006**), tandis que les métabolites secondaires sont des molécules organiques qui ne jouent pas un rôle direct dans la croissance et ni dans le développement, mais ont des applications essentielles dans la recherche en nutrition humaine. Ces derniers se divisent en trois groupes principaux : les terpènes, les composés azotés et les composés phénoliques (**Agostini-Costa et al., 2012**) et présentent diverses propriétés biologiques chez l’être humain tels que : activités antidiabétiques, anticancéreuses, antibiotiques, antivirales, anti-inflammatoire, inhibitrices d’enzymes, protectrices du système cardiovasculaire et neuroprotectrices (**Pinar et Rodriguez-Couto, 2024**).

L’arbre **Ginkgo biloba L.** (Ginkgoaceae), qui a longtemps poussé en Chine, n’a vu sa véritable valeur reconnue qu’au cours des vingt dernières années. Considéré comme sacré pour ses vertus bénéfiques pour la santé, il est un arbre ancien de grande importance (**Smith et al., 1995**).

Les parties médicinales du **Ginkgo** utilisées en phytothérapie sont principalement les feuilles et les graines, fraîches ou séchées, après élimination de leur enveloppe charnue. Cette plante renferme de nombreux composés actifs, parmi lesquels les flavanols, les glycosides et les trilactones terpéniques, qui jouent un rôle essentiel dans ses propriétés thérapeutiques. Grâce à ses principes actifs, son extrait améliore la circulation sanguine, réduit le risque de formation de caillots et renforce les parois capillaires. Il protège également les cellules nerveuses contre les dommages causés par un manque d’oxygène, ce qui en fait un allié dans le traitement des

Troubles cognitifs, tels que la démence, les difficultés de concentration et les troubles de la mémoire, notamment chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (**Singh et al., 2008**).

Le concept de stress oxydatif a été introduit en 1985, marquant un tournant important dans la recherche en biologie redox et en médecine. Les travaux scientifiques menés à cette époque se sont focalisés sur l'identification des sources des agents oxydants et antioxydants, ainsi que sur l'analyse de leurs mécanismes d'action (**Sies, 2015**).

Il désigne un déséquilibre entre la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les mécanismes antioxydants de l'organisme. Lorsque la production de ces espèces réactives dépasse la capacité de défense de l'organisme, il provoque des altérations structurales et fonctionnelles des cellules et de leurs constituants. Ce phénomène est impliqué dans de nombreuses maladies, telles que le syndrome métabolique, les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, les troubles neurodégénératifs, etc. Ce stress peut provenir de sources internes ou externes (**Vona et al., 2021**).

L'objectif de notre étude est de réaliser une analyse phytochimique approfondie de la plante *Ginkgo biloba* L. et d'évaluer ses principales activités biologiques, en particulier ses propriétés antioxydantes, enzymatiques, antibactériennes et antifongiques. Elle est structurée de manière méthodique et se compose des parties suivantes :

- La première partie de ce mémoire est consacrée à une revue bibliographique approfondie. Elle comprend un premier chapitre portant sur l'étude botanique de la plante étudiée, suivi d'une présentation des activités biologiques, notamment ses propriétés antioxydantes, antidiabétiques, antibactériennes et antifongiques.
- La seconde partie de ce manuscrit est dédiée à l'investigation expérimentale, structurée en deux chapitres distincts. Le premier chapitre décrit en détail les matériaux utilisés ainsi que les protocoles méthodologiques appliqués pour l'étude qualitative et quantitative du plante et l'évaluation des diverses activités biologique (antioxydante, antidiabétique, antibactérienne et antifongique). Le second chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus, suivie de leur discussion scientifique.
- Enfin, une conclusion présentera les principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives.

Chapitre 01 :
Etude Bibliographique

I. Etude botanique sur la plante

1. Définition

Le *Ginkgo biloba* L., plus couramment appelée ginkgo, est l'un des arbres les plus anciennes de planète. Souvent désigné comme un "fossile vivant", il est la seule espèce survivante de la famille des Ginkgoaceae. Originaire de Chine, cette plante a été cultivée en Asie. (**Sena et Aynur , 2022**). Pendant des siècles, le ginkgo a captivé l'humanité grâce à son rôle crucial en biologie et en médecine, tout comme pour son influence en tant qu'élément inspirant artistiquement et spirituellement (**Zhao et al., 2019**) ; cet arbre possède des feuilles charnues et en forme d'éventail, des graines de couleur jaune malodorantes qui cachent un noyau argenté et comestible à l'intérieur (**Strømgaard et Nakanishi, 2004**).



Figure 1 : l'arbre de *Ginkgo biloba* (site web)

2. Distribution de *Ginkgo biloba*

Les arbres de ginkgo se trouvent dans le monde entier, sauf en Antarctique, et possèdent une longue histoire dans la région Chine-Japon-Corée (CJK), poussant souvent à proximité de temples et de villages. Introduit initialement en Europe depuis le Japon en 1730, mais des recherches récentes suggèrent que les plus anciens arbres européens proviennent directement de Chine. Par la suite, le ginkgo fut introduit depuis l'Europe en Amérique du Nord.

Aujourd'hui, le ginkgo pousse dans tous les pays européens à climat tempéré, avec une présence avérée dans 18 nations. Il fut planté pour la première fois aux États-Unis en 1784 et se répand désormais dans plus de 30 États, en particulier le long des côtes Est et Ouest. En

outre, les arbres de ginkgo ont été plantés de manière sporadique au Canada, au Mexique, en Amérique du Sud, en Afrique du Sud, en Russie, en Iran, au Kazakhstan, en Inde, en Australie et en Nouvelle-Zélande (**Lin et al., 2021**).

Il a été trouvé aussi dans la grand jardin HAMMA d'Alger, en tant que l'une des espèces végétales remarquables de ce jardin pour sa riche biodiversité (**Hafidi et Tébaibia , 2024**).

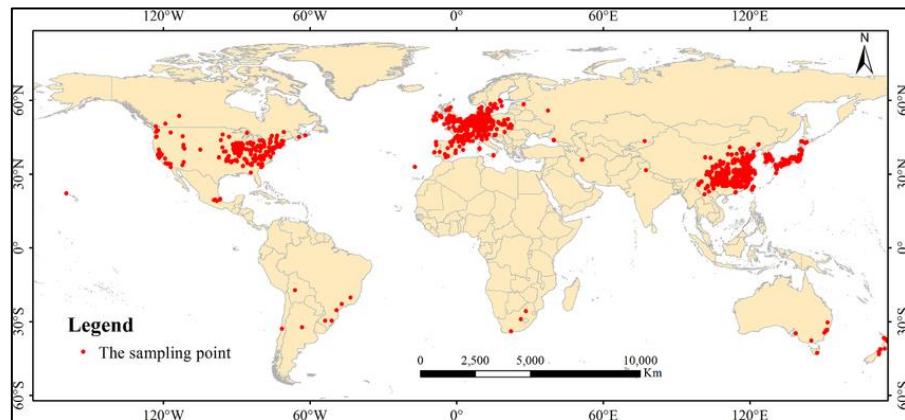


Figure 2 : Distribution géographique de *Ginkgo biloba* ([site web](#))

3. Description botanique

Le *Ginkgo biloba* appartient à la famille des Ginkgoaceae et est également connu sous les noms *Salisburiaadiantifolia*, *Salisburiamacrophylla* et *Pterophyllasalisburia*. Cet arbre dioïque présente une séparation des sexes, avec des individus portant soit des organes reproducteurs mâles, soit des organes femelles. Il peut atteindre environ 30 mètres de hauteur et posséder un tronc d'un diamètre pouvant aller jusqu'à 7 mètres. Les jeunes plants rappellent les conifères et se distinguent par leurs feuilles en éventail à deux lobes. Le Ginkgo se distingue par sa résistance à la pollution et aux ravageurs (**McKenna et al., 2001**).

3.1. Classification systématique

Tableau 1 : Classification de l'espèce *Ginkgo biloba L.* (**Ghedira et al., 2012**).

Règne	Plantae (végétal)
Division	Tracheophyta (plante vasculaire)
Subdivision	Spermatophytina (phanérogames)
Infra division	Gymnospermae
Classe	Ginkgoopsida
Ordre	Ginkgoales
Famille	Ginkgoaceae
Genre	Ginkgo L.
Espèce	<i>Ginkgo biloba L.</i>

3.2. Les souches mâles et femelles

Le Ginkgo est une espèce dioïque, avec des individus mâles et femelles distincts. Il atteint sa maturité sexuelle après 20 à 30 ans. Les organes sexuels se développent sur des pousses courtes. Les chatons mâles apparaissent avant les feuilles et libèrent leur pollen avant de tomber. La pollinisation se fait par l'air, Les ovules, mesurant 2 à 3 mm, se forment en paires et sécrètent une gouttelette mucilagineuse pour capturer le pollen. Celui-ci est ensuite transporté dans la chambre pollinique, où le gamétophyte mâle se développe sur une période de quatre mois. Le développement du Ginkgo culmine avec la production de spermatozoïdes multi flagellés, dont l'un féconde un ovule encore attaché à l'arbre. L'embryon est entouré du tissu du gamétophyte femelle et d'un tégument épais composé de trois couches : une externe charnue (sarcotesta), une intermédiaire dure et une interne membraneuse. Les ovules, verts au départ, jaunissent en automne sous l'effet du froid et tombent environ un mois après la fécondation. L'odeur nauséabonde des graines apparaît à maturité (**Singh et al., 2008**).

3.3. L'écorce

Elle change au fil du temps, passant du brun au gris, délisse à craqueler puis onduler. (**Cadet, 2017**).

3.4. Les feuilles

Ginkgo biloba se distingue par des feuilles de couleur variable (du jaune pâle au vert foncé) et une morphologie foliaire particulière. Les feuilles sont hypostomatiques, c'est-à-dire que les stomates présents uniquement sur leur face inférieure. L'arbre développe des rameaux longs et courts à angles droits. Au printemps, les feuilles alternes se déploient sur les rameaux longs. De forme en éventail, elles sont coriaces, lisses, et souvent bilobées, caractéristique à l'origine du nom spécifique biloba (**More et al., 2021**).



Figure 3 : feuille de *Ginkgo biloba* (Brachet, 2023).

3.5. Les fruits

Le fruit est une « drupe » à aspect de prune jaune dont les téguments, en se décomposant, dégagent une odeur désagréable d'acides propionique et butyrique (**Ghedira et al., 2012**)



Figure 4 : fruits de *Ginkgo biloba* (site web).

3.6. Les fleurs

Les fleurs sont petites et jaunes. Elles possèdent quatre pétales en forme d'étroites lanières. Les inflorescences apparaissent tardivement et ne s'épanouissent qu'à l'automne, après la chute des feuilles. (**Claudie, 2014**).



Figure 5 : les fleurs du *Ginkgo biloba* (site web).

4. Les composés chimiques

Cette plante contient des composés chimiques prometteurs tels que les flavonoïdes, les terpénoïdes et les acides organiques, qui ont le potentiel d'influencer sur divers processus biologiques (**Tabassum *et al.*, 2022**).

4.1. Les flavonoïdes

4.1.1. Définition

Les feuilles de Ginkgo contiennent une large gamme de glycosides de flavonol, principalement à base de kaempférol et quercétine, présents sous forme de mono-, di- et triglycosides. Des flavonoïdes mineurs dérivent de l'isorhamnétine, la myricétine, l'apigénine et la lutéoline. Certains glycosides de flavonol sont estérifiés avec l'acide p-coumarique, servant de marqueurs clés pour le contrôle de qualité des extraits de Ginkgo. De plus, des biflavonoïdes non glycosidiques et des proanthocyanidines ont été identifiés (**Sticher et al., 2000**).

Des traitements à base de plantes contenant ces composés ont été employés dans la médecine traditionnelle partout dans le monde (**Ghedira, 2005**).

4.1.2. Les structures chimiques

Tous les flavonoïdes proviennent de la séquence benzo- γ -pyrone et peuvent être catégorisés en fonction des divers substituants présents sur les cycles de la molécule ainsi que du niveau de saturation du squelette benzo- γ -pyrone (**Di Carlo et al., 1999**).

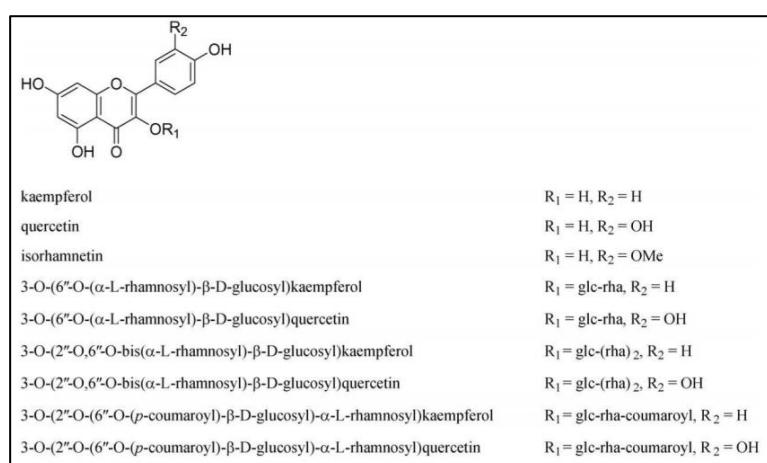


Figure 6 : Formules développées des principaux glycosides flavonol présents dans *G. biloba* (van Beek, Montoro, 2009).

4.2. Les Terpénoïdes

Le Ginkgo contient divers types de terpènes, y compris les ginkgolides et le bilobalide (terpènes trilactones), les triterpènes comme les stéroïdes et les phytostérols, ainsi que les caroténoïdes, polyprénols et terpènes volatils (mono- et sesquiterpènes). Particulièrement, on n'a identifié les terpènes trilactones que dans le *Ginkgo biloba* (**hasler, 2000**).

4.2.1. Les Ginkgolides

Parmi toutes les classes de composés présentes dans *Ginkgo biloba*, les trilactones terpéniques (TTLs) ont suscité le plus d'attention. Les trois principaux TTLs, appelés ginkgolides A, B et C (abrégés en G-A, G-B et G-C), ont été isolés pour la première fois en 1932 (**van Beek et Montoro, 2009**). Ces composés appartiennent à la famille des diterpènes et se caractérisent par une structure rigide en forme de cage, composée de six cycles à cinq chaînons, ainsi que par des groupes t-Bu distinctifs (**Tanaka et al., 2005**).

- **Le Ginkgolide A**

Le ginkgolide A (GA) est un diterpène doté de deux groupes hydroxyles secondaires en C1 et C10. Toutefois, à la différence des autres ginkgolides, il ne possède pas de substitution hydroxyle en position 2. Sa formule moléculaire est $C_{20}H_{24}O_9$, et son poids moléculaire est de 408,399 Da (**Sarkar et al., 2020**).

Dans un contexte inflammatoire, la production de PAF active ses récepteurs (PAFR) et induit la synthèse de protéines pro-inflammatoires. Le ginkgolide A (GA), en tant qu'antagoniste de ces récepteurs, inhibe cette voie de signalisation. Il en résulte une modulation de la réponse immunitaire et une neuroprotection contre les lésions provoquées par l'ischémie et l'excitotoxicité (**Nash et Shah, 2015**).

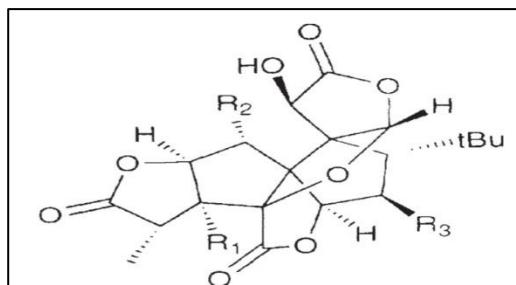
- **Le Ginkgolide B**

Ginkgolide B est le plus puissant antagoniste du facteur d'activation des plaquettes (PAF). Il possède de nombreuses propriétés bénéfiques, notamment des effets anti-inflammatoires, antiallergiques, antioxydants et neuroprotecteurs, ce qui lui confère une action thérapeutique significative contre diverses maladies. Sa structure chimique se distingue par la présence de deux groupes hydroxyles en C1 et C3 du squelette spironane. Sur le plan physico-chimique, il présente une grande similarité avec le sesquiterpène bilobalide (**Shi-hai et Dian-chun, 2007**).

- **Le Ginkgolide C**

Le Ginkgolide C (GC), extrait de *Ginkgo biloba L.*, est un flavonoïde aux multiples fonctions biologiques et effets pharmacologiques variés (**MA et al., 2022**).

Sa structure se distingue par la présence de groupements OH sur toutes les positions R, ce qui influence son affinité et sa stabilité. Comparé au GB, il s'est révélé moins puissant en tant qu'antagoniste du PAF. Cette faible activité est attribuée à la présence d'un groupement 7 β -OH, absent dans les autres ginkgolides (**Nash et Shah, 2015**).



(A)

Ginkgolide	R1	R2	R3
A	OH	H	H
B	OH	OH	H
C	OH	OH	OH

(B)

Figure 7 : Classification des ginkgolides ; (A) Structure chimique générale des ginkgolides ; (B) Classification des ginkgolides en fonction du substituant de la structure centrale (**Gachowska et al., 2021**).

4.2.1. Le Bilobalide

Le bilobalide est un sesquiterpène trilactone extrait des feuilles de *Ginkgo biloba* (**Huang et al., 2003**) ; Contrairement aux ginkgolides, il n'affecte pas le facteur d'activation des plaquettes (PAF) et présente une toxicité réduite; Son activité insecticide résulte de la stimulation des récepteurs résistant à la dielidine (RDL) et des canaux ioniques activés par l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) (**Baker et al., 2019**) ; Sa structure unique se compose de quatre cycles à cinq chaînes, incluant trois lactones et un cycle carboxylique, ainsi qu'un groupe tert-butyle. Il possède diverses propriétés bénéfiques, notamment anti-inflammatoires, protectrices de l'endothélium, cardiaques, antiplaquettaires et antioxydantes, comme le démontrent les études cellulaires et animales (**Liu et al., 2018**). Sur le plan thérapeutique, le bilobalide est utilisé pour soulager les symptômes de la démence légère à modérée, le déclin

cognitif lié à l'âge et certains troubles neurologiques sensoriels associés au vieillissement (**Huang et al., 2003**).

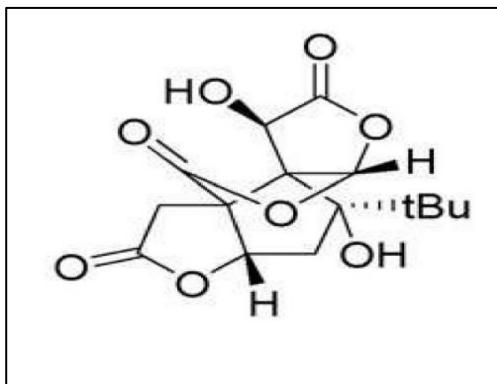


Figure 8 : Formules structurales du bilobalide (**Sticher, 1993**).

4.3. Autres composants

Les feuilles de *Ginkgo biloba* renferment une diversité d'acides organiques classés en deux groupes : **les acides non phénoliques** (notamment l'acide ascorbique, l'acide D-glucarique, l'acide quinique et l'acide shikimique) et **les acides phénoliques** (tels que l'acide protocatéchuique, p-hydroxybenzoïque, vanillique, caféïque, p-coumarique, férulique et chlorogénique). Un acide phénolique rare contenant de l'azote, appelé **acide 6-hydroxykynurénique**, y a aussi été identifié. D'autre part, trois classes de **composés dérivés du polyacétate** ont également été trouvées en petites quantités dans les feuilles de *G. biloba* :

- **Acides phénoliques** alkyliques, comme l'acide ginkgolique,
- **Phénols alkyliques**, tels que les cardanols et le cardol,
- **Lipides catécholiques**, comme les urushiols,

De plus, les feuilles de *Ginkgo biloba* contiennent en petites quantités **des glucides**, ainsi que divers **composés organiques et inorganiques** (**Jara et al., 2013**).

5. Propriétés pharmacologique

Le *Ginkgo biloba* est une plante médicinale aux multiples effets pharmacologique. Il agit comme antioxydant en neutralisant les radicaux libres contribuant ainsi à la protection contre le stress oxydatif (**Mahadevan et Park, 2008**). Exerce des effets anxiolytiques notables en modulant l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et les concentrations de neurotransmetteurs centraux, tels que la sérotonine et la noradrénaline (**Chan et al., 2007**)

(White *et al.*, 1996). Sur le plan métabolique, il améliore la sensibilité à l'insuline et réduit l'inflammation, ce qui lui confère un effet antidiabétique (Priyanka *et al.*, 2017).

En outre, ses composés flavonoïdiques sont associés à des effets anti-inflammatoires (Malek, 2019)) utilisés historiquement dans le traitement des affections respiratoires (Zhu Tao *et al.*, 2019). Il protège aussi le système nerveux, améliorant la circulation cérébrale et prévenant les maladies comme Alzheimer (Zuo *et al.*, 2017). Enfin, *Ginkgo biloba* se distingue par ses effets cardioprotecteurs, limitant les lésions ischémiques, réduisant le stress oxydatif myocardique et améliorant la fonction cardiaque post-reperfusion (Mahadevan et Park, 2008).

6. Effets indésirables

Des études ont montré des effets secondaires lors de la consommation excessive d'extrait de feuilles de Ginkgo, notamment : douleurs dorsales, nausées, somnolence, maux de tête, troubles gastro-intestinaux, réactions allergiques cutanées et hémianopsie gauche. (Kleijnen et Knipschild, 1992) (Vale, 1998) (Benjamin *et al.*, 2001)

Par ailleurs, la présence de ginkgotoxine (4-O-méthylpyridoxine), principalement dans les graines de ginkgo et aussi dans les feuilles, constitue une antivitamine B6 à effet neurotoxique en raison de son inhibition de la synthèse de l'acide gamma-aminobutyrique dans le cerveau, ce qui peut provoquer des crises (Arenz, 1996).

L'extrait de feuille de Ginkgo peut entraîner des saignements excessifs, en particulier à fortes doses, en raison de son effet inhibiteur sur le facteur d'activation plaquettaire (PAF). Il est également susceptible d'interagir avec plusieurs classes de médicaments, notamment les anticoagulants, les antidépresseurs, les antiépileptiques, les antidiabétiques, les diurétiques, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), ainsi qu'avec certains traitements à base de plantes (Mahadevan et Park, 2008).

Les doses thérapeutiques recommandées de l'extrait standardisé (contenant 24 % de flavonoïdes et 6 % de lactones terpéniques) se situent généralement entre 120 et 240 mg par jour. Toutefois, des effets indésirables graves, tels que des hémorragies intracrâniennes ou oculaires, ont été rapportés dans les cas suivants :

- Administration de doses supérieures à 240 mg/jour,
- Utilisation prolongée,

- Ou association avec des médicaments anticoagulants ou antiplaquettaires (comme l'aspirine, la warfarine ou le clopidogrel).

7. Les travaux antérieurs sur l'espèce *G.biloba* L.

Les études réalisées jusqu'à ce jour sur *Ginkgo biloba* L. portent essentiellement sur l'évaluation de ses activités biologiques et la composition chimique des extraits issus de la poudre de feuilles de cette plante. Parmi ces travaux sont cités dans le tableau suivant :

Tableau 2 : les travaux scientifiques sur le *Ginkgo Biloba*.

Chercheurs	Les recherches scientifiques
Anita Pandey (2013)	<p>Cette étude explore l'influence des facteurs environnementaux (localisation géographique, variation saisonnière) et des systèmes d'extraction (différents solvants) sur la composition phytochimique et l'activité antioxydante des feuilles de <i>Ginkgo biloba</i>. Les résultats révèlent une accumulation maximale de composés phénoliques et flavonoïdiques durant la saison automnale. Parmi les solvants testés, le mélange acétone/eau s'est avéré le plus performant pour l'extraction des polyphénols, tandis que le méthanol a montré une efficacité supérieure pour l'activité antioxydante. L'analyse factorielle a mis en évidence une corrélation statistiquement significative entre la teneur en phénols et la capacité antioxydante.</p> <p>Ces résultats confirment le potentiel thérapeutique de <i>Ginkgo biloba</i> et soulignent l'intérêt de son exploitation dans le domaine pharmaceutique.</p>
Barbalho <i>et al.</i>, (2020)	<p>Ont étudié les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de <i>Ginkgo biloba</i>. Grâce à ses composés bioactifs (les flavonoïdes et ginkgolides), cette plante contribue à la réduction des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, module positivement les enzymes antioxydantes et à l'inhibition des médiateurs inflammatoires. Ces résultats suggèrent que le <i>Ginkgo biloba</i> constitue une option naturelle, efficace pour la prévention et le traitement de ces affections.</p>

Priyanka sati et al., (2017)	<p>Cette étude explore l'influence de quatre techniques d'extraction (macération, reflux, agitation orbitale et Soxhlet) sur la teneur en glycosides flavonoïdiques des feuilles de <i>Ginkgo biloba</i> collectées sur six sites himalayens, en établissant un lien entre ces variations et leurs activités antimicrobiennes et antioxydantes. L'extraction par reflux à l'éthanol s'est avérée la plus performante, offrant les concentrations les plus élevées en flavonoïdes (quercétine, kaempférol, isorhamnétine) et les meilleurs effets biologiques. L'association de ces trois flavonoïdes a permis d'obtenir une activité antibactérienne supérieure, suggérant un effet synergique. Le site de récolte et l'altitude influencent également la composition. Ainsi, le reflux est recommandé comme méthode optimale pour produire des extraits de <i>Ginkgo</i> à haute activité bioactive.</p>
H. Aqababa et al., (2013)	<p>Cette étude examine l'effet de l'extrait de <i>Ginkgo biloba</i> sur la mémoire chez des rats Wistar. Les animaux ont reçu différentes doses de l'extrait, et les résultats montrent que la dose de 65 mg/kg améliore significativement l'apprentissage par évitement. Cette amélioration cognitive est corrélée à une élévation du taux de cortisol plasmatique, ainsi qu'aux effets vasodilatateurs et modulateurs du <i>Ginkgo biloba</i> sur les récepteurs GABA. Ces données suggèrent un potentiel thérapeutique de cet extrait dans le traitement des troubles mnésiques.</p>
Hafid Marwa Nor El-Houda et Tébaibia Bouchra (2024)	<p>Ce mémoire porte sur l'étude de l'effet de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de <i>Ginkgo biloba</i> (EMGB) sur l'inflammation colorectale induite par l'acide acétique chez la souris, ainsi que sur l'évaluation de ses propriétés toxiques et analgésiques. Après une analyse phytochimique confirmant la présence de composés bioactifs, les auteurs ont réalisé des tests pharmacologiques montrant que l'EMGB possède une activité analgésique significative et un effet anti-inflammatoire marqué sur la colite expérimentale, avec une réduction notable des lésions macroscopiques et histopathologiques du côlon. Par ailleurs, l'étude de toxicité a indiqué que l'extrait est bien toléré sans effets délétères majeurs. Ces résultats suggèrent que l'extrait méthanolique de <i>Ginkgo biloba</i> pourrait constituer une alternative naturelle prometteuse pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, en particulier la colite, tout en présentant un profil de sécurité favorable.</p>

II. Les activités biologiques

1. Activité antioxydante

1.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydant correspond à l'incapacité de l'organisme à résister aux attaques des espèces oxygénées réactives (GOR), suite à un déséquilibre entre la génération de ces éléments et la faculté de défense des antioxydants (**Denys Durand et al, 2013**). Il induit des dommages oxydatifs majeurs au sein de cellules (**O. Sergent et al., 2001**).

Le stress oxydant découle d'un déséquilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants. Les antioxydants jouent un rôle protecteur en empêchant l'oxydation des substrats. À l'inverse, les pro-oxydants favorisent l'oxydation en générant des radicaux libres ou en altérant les mécanismes de défense antioxydants (**Pierre Leroy , 2016**).

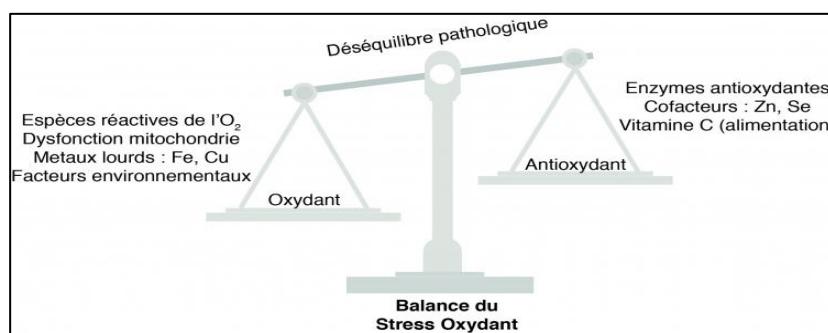


Figure 9 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants ([site web](#)).

1.2. Les radicaux libres

1.2.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique qu'il s'agisse d'une molécule, d'un fragment moléculaire ou d'un atome, caractérisée par la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés, lui conférant une grande réactivité, ce qui se traduit par une durée de vie très courte (**Goudable et Favier, 1997**). Il peut soit arracher un électron ; se comportent comme oxydant, soit en céder un en se comportant comme réducteur (**Garait, 2006**).

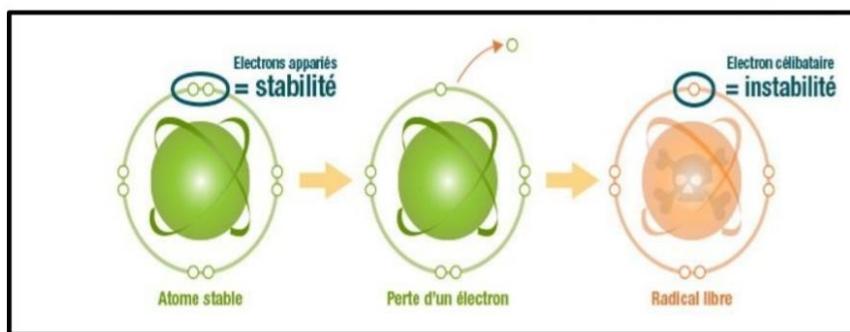


Figure 10 : La formation d'un radical libre (Layoufi et Manseur, 2021).

1.2.2. Origine des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être produits naturellement dans l'organisme lors de processus métaboliques. Toutefois diverses sources externes peuvent également favoriser leur formation.

Tableau 3 : les sources et l'origine des radicaux libres

Source	Origine	Source
Exogène	-Les radiations ionisantes _ les rayons UV -Métaux lourds -Exposition à l'ozone	(Sharifi-Rad et al., 2020)
Endogène	-Cellules phagocytaires -Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) -Chaîne respiratoire mitochondriale	(Favier, 2003)

1.2.3. Types des radicaux libres

Les radicaux libres les plus importants en biologie sont les radicaux centrés sur l'oxygène, appelés espèces réactives de l'oxygène (ROS), et les molécules centrées sur l'azote, appelées espèces réactives de l'azote (RNS) (Tvrđa et Benko, 2020).

A. Espèce réactive de l'oxygène

L'oxygène, bien que vital pour la survie, peut avoir des effets néfastes sur l'organisme en favorisant la formation de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (Haleng et al., 2007). Ces ERO représentent la principale classe de radicaux libres dans les systèmes

biologiques, en raison du rôle essentiel du métabolisme aérobie (Valko *et al.*, 2007). Elles se divisent en deux catégories :

- **Les ERO primaires** : issues directement de la réduction du dioxygène (O_2), elles sont plus réactives tel l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\bullet} .

- **Les ERO secondaires** : résultent des réactions entre les ERO primaires et divers composés biochimiques présents dans la cellule tel -Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , -Oxygène singulet 1O_2 (Pourrut, 2008).

B. Espèces réactives de l'azote (ERN)

Dans les systèmes biologiques, la principale source de toutes les espèces réactives de l'azote (RNS) est le monoxyde d'azote (NO) (Patel *et al.*, 1999), ce dernier (NO^{\bullet}) se produit dans toutes les cellules du corps grâce à une enzyme appelée NOS, lorsqu'il est généré en excès de manière non régulée, il devient délétère, favorisant le stress oxydatif et nitrosant via la formation d'espèces réactives telles qu'ion peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$) et trioxyde de diazote (N_2O_3) (Massion *et al.*, 2002).

Les (ROS) et les (RNS) peuvent être regroupées en deux grandes catégories de composés : les formes radicalaires et les formes non radicalaires (tableau 4).

Tableau 4 : les espèces réactives radicalaires et non radicalaires

(Tvrdà et Benko, 2020) (Pourrut, 2008)

Types des ERO		Réaction
Radicalaires	Anion Superoxyde $O_2^{\bullet-}$	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$
	Hydroxyle HO^{\bullet}	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO^{\bullet}$
	Peroxyle $ROO^{\bullet-}$	$ROOH + Fe^{3+} \rightarrow ROO^{\bullet-} + Fe^{2+} + H^+$
	Alkoxyde RO^{\bullet}	$ROOH + Fe^{2+} \rightarrow RO^{\bullet} + Fe^{3+} + H_2O$
	Hydroperoxyde HO_2^{\bullet}	$H^+ + O_2^{\bullet-} \rightarrow HO^{\bullet}$

	Oxyde nitrique	$\text{L-Arginine} + \text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow \text{L-Citrulline} + \text{NO}$ NADP^+
	Dioxyde nitric	$\text{ONOOH} \rightarrow \bullet\text{NO}_2 + \bullet\text{OH}$
Non radicalaires	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2	$2\text{O}_2\bullet + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
	Oxygène singulet 1O_2	$\text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 1\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}$
	Proxynitrite ONNO^-	$\text{NO}^\bullet + \text{O}_2^\bullet \rightarrow \text{ONOO}^-$

1.3. Défense Antioxydant

Le terme « antioxydants » désigne un groupe de substances ou de composés de natures diverses dont la caractéristique commune est leur capacité à inhiber ou à réguler l'accumulation de radicaux libres au niveau cellulaire. Cette propriété leur permet d'agir directement ou indirectement comme défense contre les dérivés de l'oxygène (**Gomdje, 2013**). L'être humain possède des systèmes antioxydants sophistiqués enzymatiques et non enzymatiques qui sont produits par l'organisme ou apportés par l'alimentation ou des compléments alimentaires (**Rahman, 2007**).

1.3.1. Les types d'antioxydants

1) Système endogène

a) Antioxydant enzymatique

- La superoxyde dismutase (SOD)

Cet enzyme catalyse la conversion d'un radical hautement réactif en un radical de moindre réactivité, selon le mécanisme réactionnel suivant : $2\text{O}_2^\bullet + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

Elle existe sous 3 formes : cytoplasmique (Cu, Zn-SOD), mitochondriale (Mn-SOD) et extracellulaire (Ec-SOD) (**Lubrano et Balzan, 2015**).

- La catalase (CAT)

La catalase est une enzyme intervenant dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène selon cette réaction : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Elle est localisée majoritairement dans les peroxysomes (80 %). L'efficacité catalytique de la catalase repose sur la stabilité de sa structure tétramérique, dont la dissociation des sous-unités entraîne la perte de son activité enzymatique. (Yi, 1990).

- **La glutathion peroxydase (GPx)**

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme mitochondriale et parfois cytosolique qui convertit H_2O_2 en H_2O et les peroxydes lipidiques en leurs dérivés.

Elle existe sous huit formes différentes et dépend du sélénium pour son activité (Ighodaro et Akinloye, 2018).

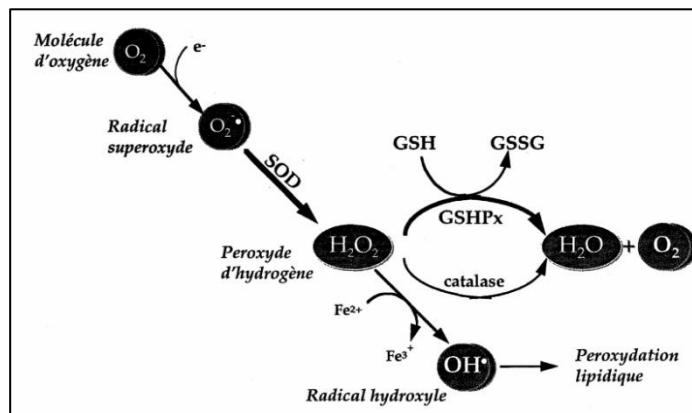


Figure 11 : Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène (Goudable et Favier, 1997).

B. Antioxydant non enzymatique

- **Glutathion**

Le glutathion est un tripeptide de faible masse moléculaire contenant un groupe thiol, Présent sous forme réduite qui facilite l'élimination du peroxyde d'hydrogène de manière indirecte. Par ailleurs, il intervient dans de nombreux processus biologiques (notamment le métabolisme de la vitamine C, ...etc.), et capable de réagir in vitro, avec les radicaux HO^\bullet , RO_2^\bullet , RO^\bullet , ONOO^\bullet , O_2 (Kohen et Nyska, 2002).

- **Acide urique**

L'acide urique (UA), qui est l'antioxydant hydrosoluble le plus abondant chez l'être humain, exerce une action neutralisante spécifique contre les radicaux hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), peroxyde

(O_2^\bullet) et peroxynitrite ($ONOO^-$), jouant ainsi un rôle physiologique protecteur potentiel en inhibant la peroxydation lipidique (**Waing, 2002**).

- **Coenzyme Q**

La coenzyme Q (ou ubiquinone) est le seul antioxydant liposoluble synthétisé naturellement par l'organisme, elle est abondante dans les tissus humains sous sa forme Q10 (**Littarru et Tiano, 2007**). La coenzyme Q réduite ($CoQH_2$) agit comme antioxydant en piégeant les radicaux libres et en empêchant la peroxydation des lipides. Elle est aussi capable de régénérer d'autres antioxydants comme la vitamine E (α -tocophérol). De plus, $CoQH_2$ peut interagir avec la superoxyde dismutase (SOD) et la DT-diaphorase pour inhiber l'auto-oxydation des quinones (**Beyer, 1992**).

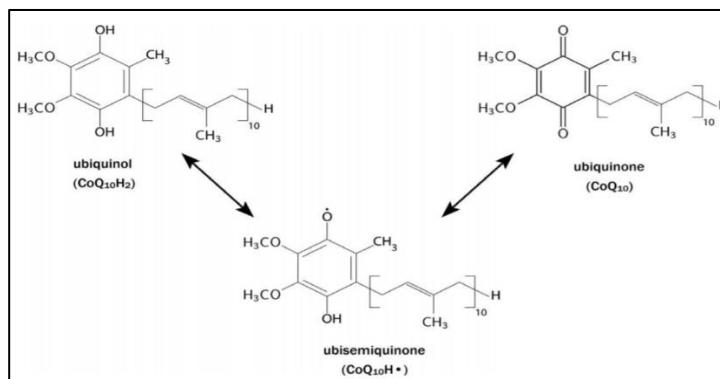


Figure 12 : Les trois états d'oxydation de la CoQ_{10} : la forme ubiquinol entièrement réduite ($CoQ_{10}H_2$), l'intermédiaire radicalaire semi-quinone ($CoQ_{10}H^-$), et la forme ubiquinone entièrement oxydée (CoQ_{10}) (**López-Lluch , 2023**).

2) Système exogène

- **Vitamine E**

La vitamine E est un composé liposoluble appartient à la famille des tocophérols, qui regroupe quatre substances distinctes : (α -, β -, γ - et δ -), l' α -tocophérol étant la forme la plus active biologiquement (**Cuvelier et al., 2003**). Elle constitue un puissant antioxydant. Son mécanisme d'action repose principalement sur l'inhibition de la peroxydation lipidique (LOO^\bullet), conduisant à la formation d'un radical tocophéroxyle peu réactif. Ce radical peut également réagir avec un second radical peroxyld, menant à la formation des autres composés stable comme la tocophérolquinone (figure13) (**Moussa et al., 2019**).

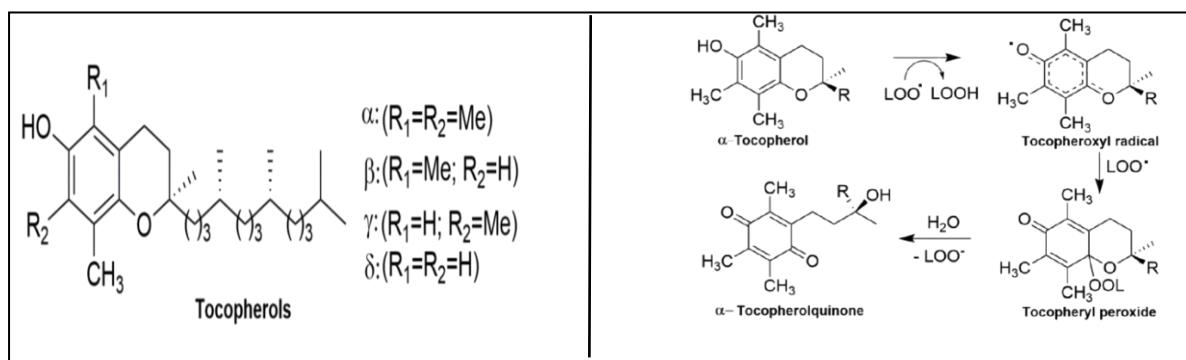


Figure 13 : Structures chimiques des tocophérols qui composent la vitamine E et arrêt de la peroxydation lipidique par l'α-tocophérol.

- **Vitamine C**

La vitamine C ou L-ascorbat est un antioxydant hydrosoluble important, capable de donner un atome d'hydrogène et de former un radical ascorbyl relativement stable. Elle est un agent efficace pour neutraliser les radicaux libres, le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde de dioxygène. Par ailleurs elle participe à la régénération de la vitamine E en tant qu'antioxydant en réduisant les radicaux tocophéroxyles. Ce processus protège les membranes lipidiques et les protéines contre les dommages oxydatifs (**Eryilmaz Pehlivan, 2017**).

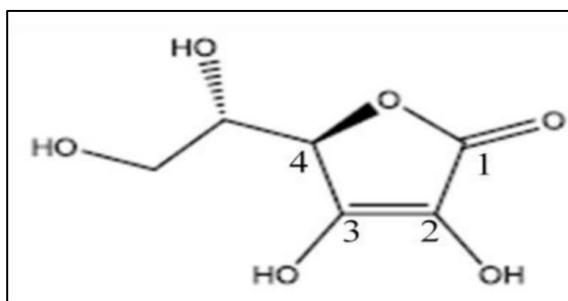


Figure 14 : structure de vitamine C (Sekli-Belaidi, 2011).

- **Oligoéléments**

Les oligo-éléments sont des nutriments essentiels en très petites quantités, ils ne neutralisent pas directement les espèces réactives de l'oxygène (ERO), mais ils sont indispensables au bon fonctionnement des enzymes antioxydantes et agissent comme cofacteurs et contribuent à leurs propriétés antioxydantes (**Desmier, 2016**) tels que : Cu, Zn, Mn, Se, Fe . Cependant, une quantité excessive d'oligo-éléments peut entraîner de graves dysfonctionnements (**Layoufi et Manseur, 2021**).

- **Polyphénols**

Toutes les parties des plantes contiennent des composés polyphénoliques, ce qui en fait un élément essentiel de l'alimentation humaine. Leurs propriétés antioxydantes et leur capacité à piéger les radicaux libres ont suscité un intérêt croissant pour ces composés. Ils neutralisent les radicaux libres par deux mécanismes principaux :

- Le transfert d'atomes d'hydrogène,
- Le transfert d'électrons unique

Ces réactions produisent des espèces stables et inoffensives pour l'organisme (**Oroian et Escriche, 2015**).

1.4. Mécanisme d'action des flavonoïdes dans l'activité antioxydante

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes représentent le groupe le plus abondant des composés phénoliques d'origine végétale. Ils sont reconnus pour leur rôle antioxydant en éliminant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). Ils sont classés en fonction de degré d'oxydation de l'anneau central C (**Rice-Evans, 2001**). Ils exercent leur activité selon plusieurs mécanismes comme :

A. Piégeage des radicaux libres

L'étude de l'interaction des flavonoïdes avec divers radicaux libres a révélé leur capacité thermodynamique à réduire plusieurs espèces radicalaires oxydantes, telles que les radicaux peroxyde, alkoxyde et hydroxyde, par un mécanisme de transfert d'hydrogène selon l'équation :



Où $\text{R}\cdot$ représente le radical libre

Le radical flavonoxy ($\text{Fl-O}\cdot$) formé au cours de cette réaction peut interagir avec d'autres espèces radicalaires, conduisant à la formation d'une structure stable de type quinone (figure 15) (**Marfak, 2003**).

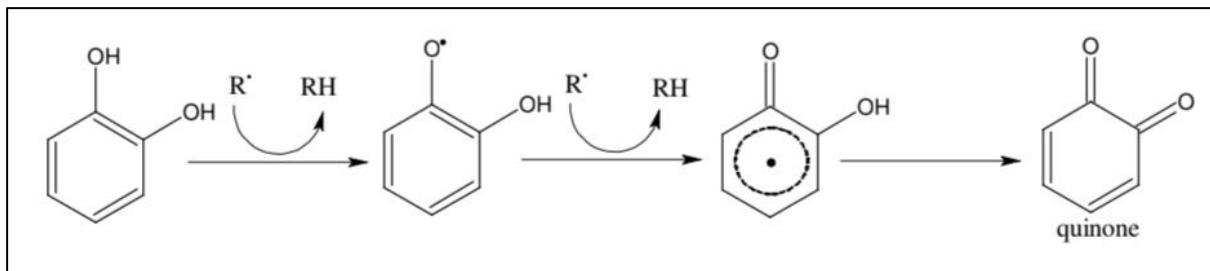


Figure 15 : Piégeage des ROS ($\text{R}\cdot$) par les flavonoïdes.

B. Inhibition d'enzymes

Les flavonoïdes possèdent la capacité d'inhiber certaines enzymes impliquées dans la production de radicaux libres, notamment la xanthine oxydase et la protéine kinase, toutes deux associées à la génération de l'anion superoxyde ($\text{O}_2\cdot$). Par ailleurs, il a été démontré que ces composés phénoliques peuvent également inhiber divers enzymes intervenant dans la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO), telles que la cyclooxygénase, la lipoxygénase, la monooxygénase microsomale, la glutathion S-transférase, la succinoxydase mitochondriale, ainsi que la NADH oxydase. Ainsi, les flavonoïdes jouent un rôle essentiel dans la régulation de la production des ERO au sein de l'organisme (Emeraux, 2019).

C. Chélation des ions métalliques

Les flavonoïdes constituent des agents chélateurs efficaces de métaux tels que le cuivre, le fer et le zinc. Ces métaux ont des fonctions physiologiques et agissent comme cofacteurs d'enzymes. Toutefois, sous leur forme libre, le fer et le cuivre peuvent favoriser la génération des radicaux libres. Les principaux sites de liaison des flavonoïdes aux métaux incluent : le noyau catéchol sur le cycle B, les groupes 3-OH et 4-oxo sur le cycle hétérocyclique C, ainsi que les groupes 4-oxo et 5-OH situés entre les cycles C et A, la glycosylation de ces groupes hydroxyles diminue la capacité de chélation des flavonoïdes (Ameni, 2015).

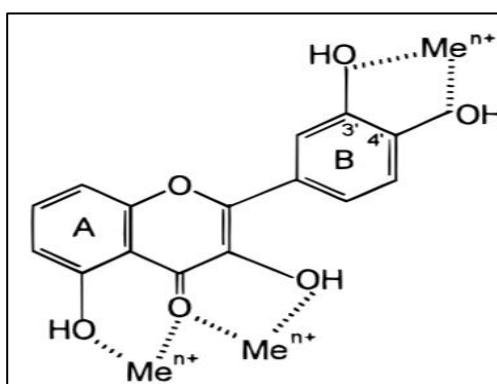


Figure 16 : Sites de liaison pour les métaux traces (Pietta , 2000)

1.5. Les effets du stress oxydatif

Lorsque les radicaux libres sont produits de manière excessive et incontrôlable, eux et leurs dérivés peuvent interagir avec diverses macromolécules cellulaires, telles que les protéines, les lipides et l'ADN, et affecter l'expression des gènes.

A. Oxydation des lipides

L'oxydation des lipides se produit lorsque les radicaux libres (ROS) oxydent les acides gras des membranes cellulaires, produisant des substances toxiques telles que les diènes conjugués, les hydroperoxydes et le malondialdéhyde (MDA). Ces composés endommagent les membranes et augmentent l'inflammation. De plus, ils peuvent altérer les fonctions cellulaires et induire des mutations génétiques susceptibles de favoriser le développement du cancer, en particulier celui du Côlon et du rectum (**Perše, 2013**).

B. Oxydation des protéines

Les radicaux libres interagissent avec les acides aminés et les peptides à travers divers mécanismes physico-chimiques (l'abstraction d'hydrogène, le transfert d'électrons, la fragmentation, le réarrangement...etc.) (**Davies, 2016**), souvent causées par des systèmes d'oxydation catalysés par des métaux (**Jarrett et Boulton, 2012**). De plus, l'accumulation des protéines endommagées inhibe le protéasome, entrave l'élimination des protéines oxydées, perturbe le fonctionnement du système lysosomal et conduit à des dysfonctionnements progressifs des organites cellulaires (**Ulf T et Terman, 2002**).

C. Oxydation de l'ADN

Les dommages oxydatifs de l'ADN résultent de réactions touchant les bases puriques, pyrimidiques, le désoxyribose ou encore la liaison phosphodiester (**Therond, 2006**), ces altérations de l'ADN sont impliquées dans divers processus pathologiques tels que le vieillissement, le diabète, les maladies inflammatoires et hépatiques. Bien que l'ADN endommagé puisse être réparé par l'action des glycosylases, un stress oxydatif important dépasse la capacité de réparation, conduisant ainsi à des mutations et au développement de cancers (**Gaté et al., 1999**).

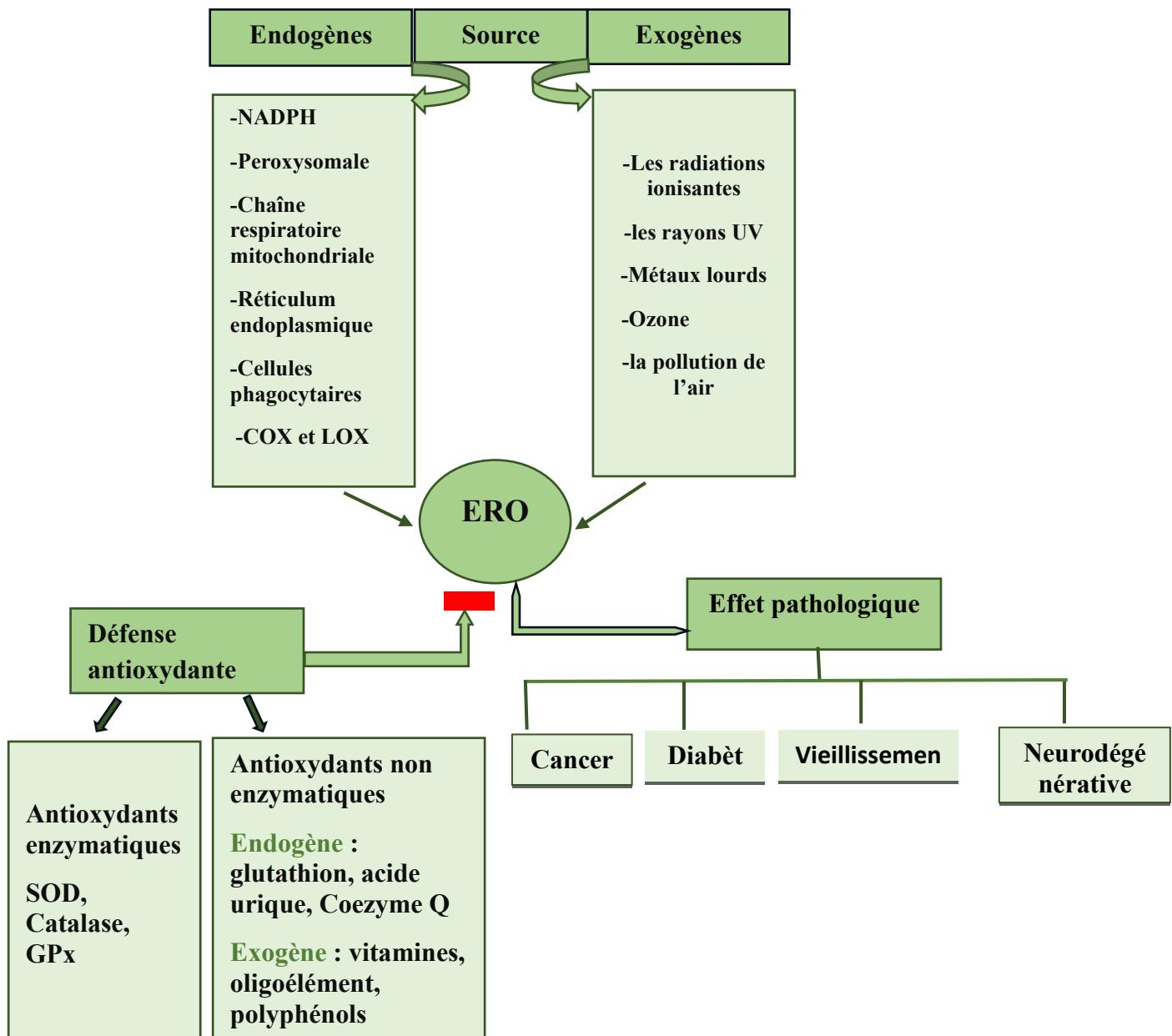


Figure 17 : Les fonctions des radicaux libres sur les biomolécules et leurs conséquences.

(Sharifi-Rad *et al.*, 2020).

II.2. Activité Enzymatique

Les enzymes sont des composés biologiques de nature protéique dotés d'une activité catalytique, produits par les cellules vivantes. Ce sont donc des biocatalyseurs. En d'autres termes, ce sont des substances qui ne subissent pas de transformation visible et qui modifient la vitesse d'une réaction chimique à faible dose (**Ouedraogo, 1986**).

2.1. Activité antidiabétique

2.1.1. Le diabète (Définition)

Le diabète sucré est une pathologie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique, due à une insuffisance de la sécrétion d'insuline, à une résistance à son action, ou d'une combinaison des deux mécanismes. L'absence d'un équilibre glycémique adéquat peut entraîner des complications sévères (cardiovasculaire, oculaires, rénales et nerveuse). Le diagnostic du diabète repose sur la mesure de la glycémie à jeun par une prise de sang, une valeur égale ou supérieure à 7 mmol/l (1,26 g/l) est évocatrice de diabète, mais doit être confirmée par une seconde analyse (**Fagot-Campagna et al., 2010**).

2.2. Enzyme alpha-amylase

A. Définition et l'origine

L'α-amylase (EC 3.2.1.1) est une enzyme de type hydrolase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons α-1,4-glycosidiques internes de l'amidon, conduisant à la formation de produits tels que le glucose et le maltose. Il s'agit d'une métalloenzyme dépendante du calcium, ce qui signifie que son activité nécessite la présence d'un cofacteur métallique (**Sundaram et Krishna Murthy, 2014**), cet enzyme est principalement sécrété par les glandes salivaires et le pancréas (**Stiefel et Keller, 1973**).

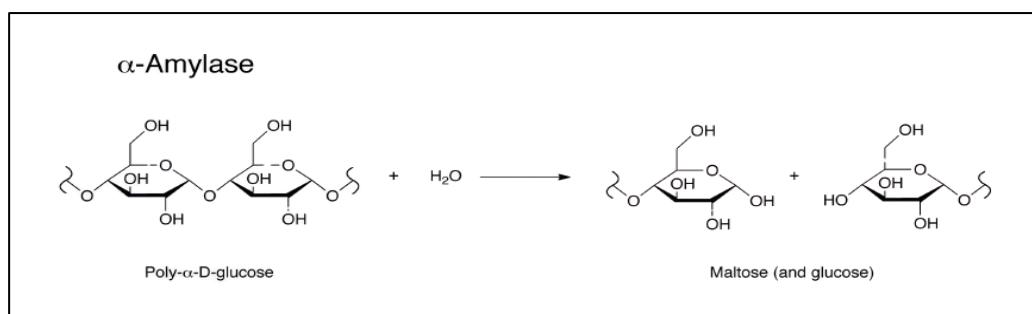


Figure 18 : Action de l'α-Amylase sur le Poly-α-D-glucose : Hydrolyse en Maltose et Glucose.

Les α -amylases constituent une classe d'enzymes omniprésentes, synthétisées par divers organismes tels que les plantes, les animaux et les micro-organismes (Ahmed *et al.*, 2019).

B. Structure et mécanisme d'action

Les α -amylases sont des enzymes multi-modulaires, caractérisées par un cœur structural conservé, constitué principalement de trois domaines : A, B et C.

– Le domaine A, le plus long, contient le site actif et les acides aminés catalytiques Glu et Asp, jouant aussi un rôle dans la thermo-résistance.

– Le domaine B, riche en feuillets β , se lie aux ions Ca^{2+} , assurant la stabilité de l'enzyme et sa protection contre les protéases.

– Le domaine C, en forme de sandwich β , participe au repliement post-traductionnel et à la sécrétion de l'enzyme. (kherouf, 2021)

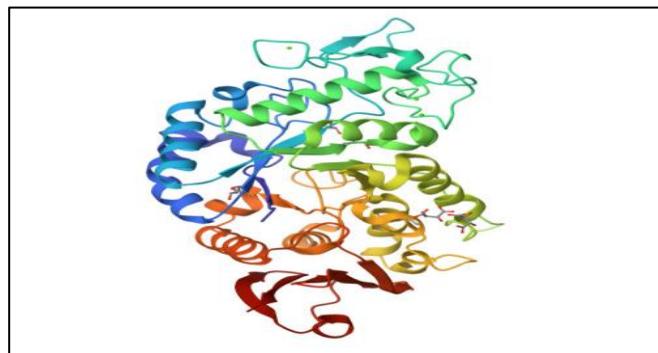


Figure 19 : structure tridimensionnelle de l'alpha-amylase (Le domaine A de couleur rouge, le domaine B de couleur bleue et le domaine C de couleur verte) (site web).

Le mécanisme d'action de l' α -amylase implique la participation de trois fonctions du site actif : un groupe jouant le rôle d'attaquant nucléophile, un autre stabilisant la charge positive de l'atome attaqué, et un troisième agissant comme donneur de proton au groupe déplacé. Cela indique que la rupture de la liaison osidique met en jeu une série de transferts d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et le substrat. Les groupes impliqués dans cette réaction au niveau du site actif comprennent deux acides carboxyliques ainsi qu'un noyau imidazole (Nouadri, 2011).

L'hyperglycémie peut être contrôlée par l'inhibition des enzymes alpha-amylase étant donné leur rôle essentiel dans la digestion des glucides et l'absorption du glucose au niveau intestinal (Nair *et al.*, 2013), cette approche thérapeutique repose sur l'utilisation de composés tels que

l'acarbose. Par ailleurs, les flavonoïdes représentent une classe de biomolécules dont les interactions variées leur confèrent une capacité inhibitrice de l' α -amylase (**Kaur et al., 2021**).

II.3. Activité antibactérienne

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires et procaryotes, capables de se multiplier rapidement. Elles sont classées en divers groupes avec des propriétés spécifiques. Certaines se nourrissent des sources organiques, tandis que d'autres produisent leur propre nourriture à partir de l'environnement. Elles peuvent être pathogènes, causant des maladies infectieuses, ou commensales, contribuant à la santé humaine (**Benayad, 2013**).

Les infections bactériennes sont traitées par des antibiotiques lesquels sont majoritairement issus de métabolites secondaires, Parmi ces composés, les phénols occupent une place importante en raison de leurs propriétés antimicrobiennes (**Cowan, 1999**), Où elles agissent sur les bactéries en altérant leur paroi cellulaire, en perturbant l'équilibre intracellulaire par acidification, et en détruisant leur matériel génétique, ce qui entraîne leur mort (**Dorman et Deans, 2000**).

II.4. Activité antifongique

Les champignons, à la différence des bactéries, sont des organismes eucaryotes capables d'infecter divers tissus chez l'être humain. Ils se présentent sous deux formes morphologiques principales : soit sous forme unicellulaire, désignée par le terme levures, soit sous forme filamenteuse, constituée d'un réseau ramifié appelé mycélium (**Chollet, 2014**).

Un antifongique est un agent thérapeutique utilisé en mycologie médicales pour traiter les mycoses. On distingue les fongicides, qui détruisent le champignon pathogène, et les fongistatiques, qui limitent son développement en attendant son élimination par le renouvellement tissulaire. La majorité des antifongiques utilisés sont des fongistatiques (**Brans, 2015**).



Chapitre 02 :

Méthodes et Matériels

❖ Lieu d'expérimentation

Notre travail a été mené au niveau du laboratoire de Biochimie de l'Université des Frères Mentouri, ainsi qu'au Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine, en Algérie.

1. Matériels

1.1. Plante étudiée

Notre étude se focalise sur *Ginkgo biloba* L., une espèce appartenant à la famille des Ginkgoaceae.

Les feuilles de *Ginkgo biloba* L., ont été acquises auprès d'un herboriste situé à Oued-Athmania, wilaya de Mila.

1.1.2. Equipements et réactifs chimiques

A. Les équipements et verreries

- Evaporateur rotatif
- Balance de précision
- Spatule
- Bécher
- Mortier
- Papier filtre Whatman
- Entonnoir
- Eprouvette
- Etuve
- Agitateur magnétique
- Vortex
- Tubes à essais, Eppendorfs
- Microplaques
- Spectrophotomètre de microplaques
- Bain marie
- Micropipettes
- Boîte de Pétri
- Barreau magnétique
- Réfrigérateur

B. Les réactifs chimiques

Tableau 05 : Les réactifs employés dans les diverses activités biologiques réalisées.

Produit	Formule chimique	Produit	Formule chimique
Eau distillée	/	Acide ascorbique	<chem>C6H8O6</chem>
Méthanol	<chem>CH3OH</chem>	Trolox,	<chem>C14H18O4</chem>
Chlorure ferrique	<chem>FeCl3</chem>	Acarbose.	<chem>C25H43NO18</chem>
Magnésium	<chem>Mg</chem>	Potassium acétate	<chem>CH3COOK</chem>
Acide chlorhydrique (HCL)	/	Carbonate de sodium	<chem>Na2CO3</chem>
DPPH(2,2-diphényl-1-picrylhydrasyl)	/	IKI (iodure de potassium)	/
ABTS	/	Enzyme α -amylase	/
Persulfate de potassium	<chem>K2S2O8</chem>	Amidon 0.1%,	/
Acide trichloracétique	<chem>TCA</chem>	Glucose	<chem>C6H12O6</chem>
Ferricyanure de potassium	<chem>K3[Fe(CN)6]</chem>	Agar-agar	<chem>C12H18O9</chem>
Phosphate monosodique	<chem>NaH2PO4</chem>	Pomme de terre	/
Tampon phosphate buffer.	/	DMSO (diméthylsulfoxyde)	/
Chlorure d'aluminium	<chem>AlCl3</chem>	La gélose de Muller – Hinton,	/

2. Méthodes

2.1. Méthode d'extraction

L'extraction est définie comme le processus de retrait ou d'obtention des composés souhaités à partir du matériau source (**kumar et al., 2023**). Elle constitue une étape essentielle pour

l'obtention des composants bioactifs des plantes, en utilisant différents solvants en fonction des propriétés des composés, telles que l'acidité, la polarité et la taille moléculaire (**Ingle et al., 2017**).

2.2. Préparation d'extrait Hydroalcoolique

A. Broyage

Les feuilles sont soigneusement débarrassées des impuretés, puis broyées à l'aide d'un mortier afin d'obtenir une poudre fine est conservée dans des flacons en verre secs afin de préserver sa couleur ainsi que ses propriétés thérapeutiques jusqu'au moment de l'analyse.

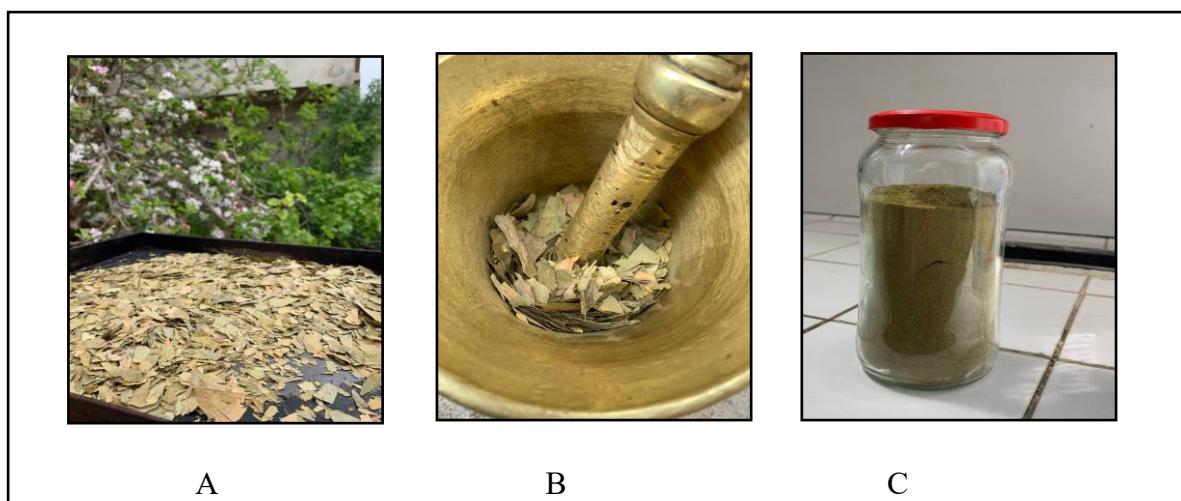


Figure 20 : les étapes de préparation du *Ginkgo biloba* pour l'extraction : (A) : nettoyage et séchage des feuilles, (B) : broyage dans un mortier, (C) : poudre végétale conditionnée dans un bocal.

B. Extraction solide-liquide (Macération)

Macération est une technique d'extraction réalisée en utilisant un solvant à froid ; le matériau végétal a été placé dans un récipient spécifique puis la quantité correspondante du solvant a été ajoutée. L'échantillon a ensuite été laissé à macérer à l'abri de la lumière pendant 72 heures à température ambiante (**Trusheva et al., 2007**).

Dans notre travail, 10 g de la poudre fine obtenue ont été pesés puis soumise à une macération à l'aide d'un solvant hydroalcoolique composé de méthanol et eau (80/20 ; V/V) pendant 24 heures. Dans un premier temps, l'extrait a été récupéré après filtration du mélange à travers d'un papier filtre Whatman. Cette opération a été répétée trois fois, avec un renouvellement du solvant chaque 24 heures.

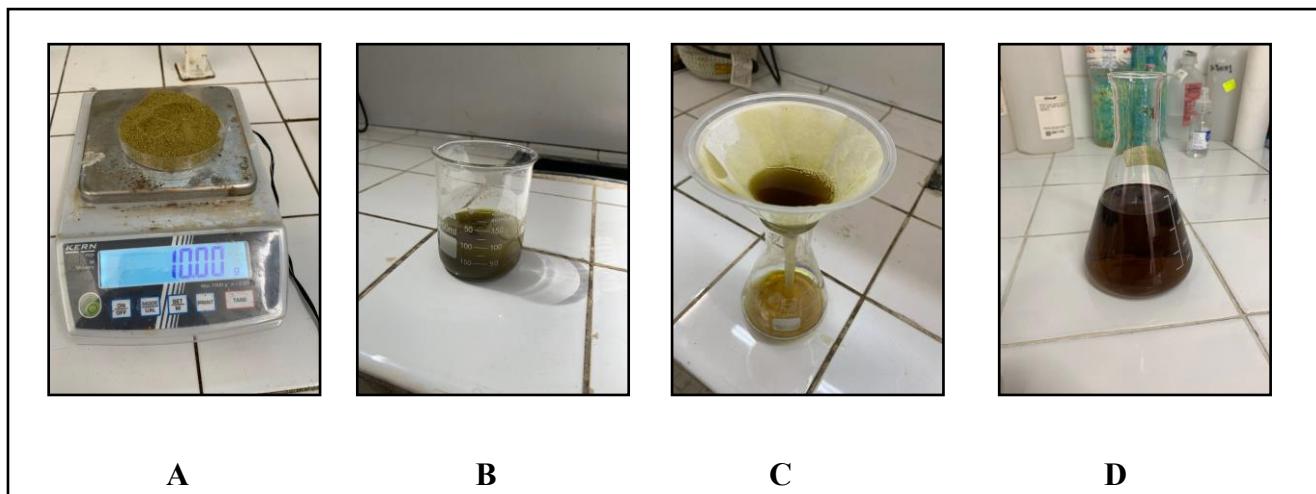


Figure 21 : (A) : peser la plante dans la balance ;(B) : mélanger la poudre de la plante avec le solvant hydroalcoolique ; (C) : filtration de l'extrait ;(D) : extrait de macération.

Les trois filtrats ont été regroupés puis concentrés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C. Les extraits obtenus ont été transférés dans des boîtes de Pétri en verre, puis placés dans une étuve à 45 °C afin d'assurer un séchage complet et d'obtenir des extraits secs qui ont ensuite été conservé au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

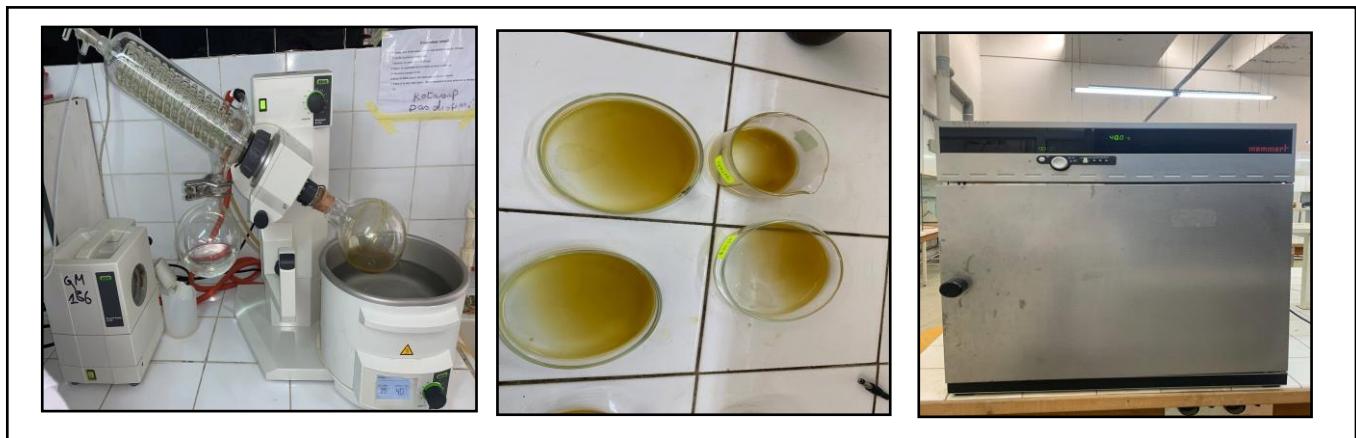


Figure 22 : les étapes de séchage pour obtenir un extrait sec.

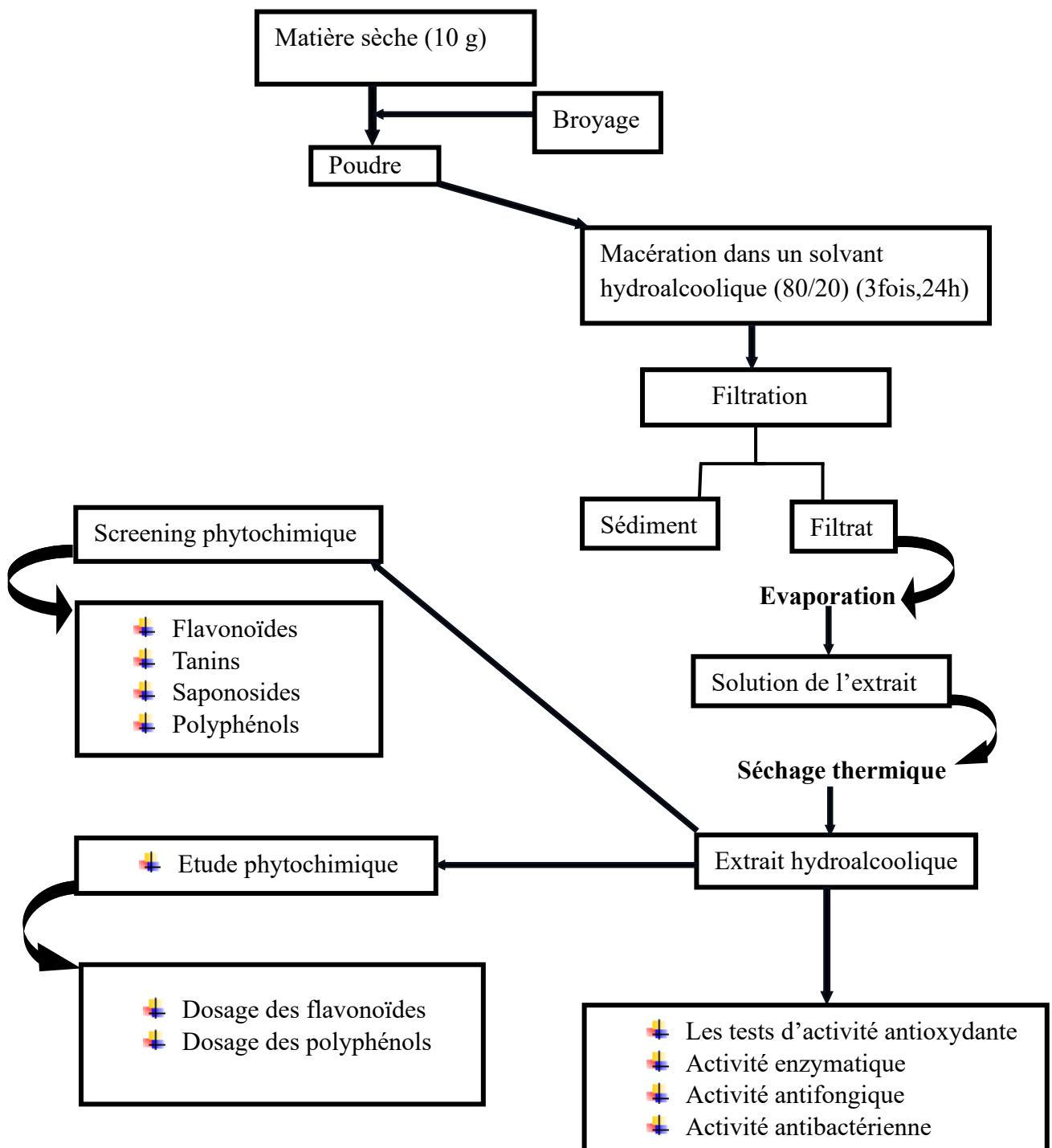


Figure 23 : schéma récapitulatif du Protocole expérimentale.

2.3. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est l'ensemble des techniques et des méthodes de détection des substances naturelles dans la plante (**Ntabaza et al., 2017**).

Ces méthodes utilisent des réactifs spécifiques pour la précipitation ou de colorations caractéristiques en vue de mettre en évidence des groupements chimiques qui peuvent être présents dans cet extrait (**Tamert et al., 2017**).

2.3.1. Test des phénols

La mise en évidence des composés polyphénoliques a été effectuée à l'aide du réactif au chlorure ferrique (FeCl_3). À cet effet, une goutte d'une solution alcoolique de chlorure ferrique à 2 % a été ajoutée à 2 ml d'extrait. L'apparition d'une coloration caractéristique, variant du bleu noirâtre à un vert plus ou moins intense, indique la présence de ces dérivés (**Bounihi , 2016**).

2.3.2. Test des flavonoïdes

La détection des flavonoïdes a été effectuée en ajoutant à 1 ml de l'extrait étudié, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré, suivi de l'introduction de trois copeaux de magnésium. Le développement d'une coloration rouge, orange ou rose témoigne de la présence de flavonoïdes (**Héritier et al., 2022**).

2.3.3. Test des tanins

Une quantité de 1 mg de l'extrait hydroalcoolique est solubilisée dans 2 ml d'eau distillée. L'ajout d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3) à 1 % permet de mettre en évidence la présence de tanins. Un virage de couleur vers le bleu-noir indique la présence de tanins galliques, tandis qu'une coloration brun-verdâtre témoigne de la présence de tanins catéchiques (**Boumadjen et kimouche, 2018**).

2.3.4. Test des saponines

La présence des saponines est évaluée de manière qualitative par le test de la mousse. Pour ce faire, 2 mg de l'extrait hydroalcoolique sont introduits dans un tube à essai contenant 2 ml d'eau distillée. Après agitation vigoureuse, la formation d'une mousse stable et persistante pendant au moins 15 minutes indique la présence de saponines (**Boumadjen et kimouche, 2018**).

2.4. Analyse phytochimique quantitative

2.4.1. Dosage des polyphénols totaux

Principe : la détermination de la teneur en polyphénols totaux s'effectue à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, selon la méthode décrite par Singleton et Rossi (**Singleton et Rossi, 1965**) et adaptée au dosage sur microplaqué par Muller (**Muller et al., 2010**).

Le réactif FCR, composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), est réduit lors de l'oxydation des composés phénoliques en un mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Il en résulte une coloration bleue dont l'intensité, mesurée entre 750 et 765 nm, est proportionnelle à la concentration en polyphénols totaux.

Mode opératoire :

- **Préparation de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% :**

7,5 grammes de carbonate de sodium sont dissous dans 100 ml d'eau distillée.

- **Préparation de l'extrait de plante :**

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de l'eau distillée (ou Méthanol).

- **Préparation de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois :**

1ml de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10ml avec l'eau distillée (9ml).

Procédure :

20 μ l d'extrait de plante + 100 μ l de FCR dilué (1/10) + 80 μ l de carbonate de sodium (7,5%) + mettre le mélange à l'obscurité pendant 2h + lecture à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol).

Pour la Gamme d'étalonnage de l'acide gallique (Une quantité de 1 mg d'acide gallique est dissoute dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution mère), les dilutions ont été préparées comme suit :

25 μ g/ml \rightarrow 25 μ l de SM + 175 μ l de méthanol.

50 μ g/ml \rightarrow 50 μ l de SM + 150 μ l de méthanol.

75 μ g/ml \rightarrow 75 μ l de SM + 125 μ l de méthanol.

100 µg/ml → 100 µl de SM + 100 µl de méthanol.

125 µg/ml → 125 µl de SM + 75 µl méthanol.

150 µg/ml → 150 µl de SM + 50 µl de méthanol.

175 µg/ml → 175 µl de SM + 25 µl de méthanol.

200 µg/ml → 200 µl de la SM.

2.4.2 Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al³⁺ et les flavonoïdes. La méthode de Topcu (**Topcu et al., 2007**) est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaqué 96 puits.

Pour la gamme d'étalon de la Quercétine (Une quantité de 1 mg de la Quercétine est dissoute dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution mère). Les dilutions ont été préparées comme suit :

25 µg/ml → 25 µl de SM + 175 µl de méthanol.

50 µg/ml → 50 µl de SM + 150 µl de méthanol.

75 µg/ml → 75 µl de SM + 125 µl de méthanol.

100 µg/ml → 100 µl de SM + 100 µl de méthanol.

125 µg/ml → 125 µl de SM + 75 µl méthanol.

150 µg/ml → 150 µl de SM + 50 µl de méthanol.

175 µg/ml → 175 µl de SM + 25 µl de méthanol.

200 µg/ml → 200 µl de la SM.

Mode opératoire

- **Préparation des solutions :**

Pour 1 M du Potassium acétate (CH₃COOK) on dissolve 9.80 grammes de (CH₃COOK) dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir la solution une.

Pour 10% Chlorure d'aluminium (AlCl₃) on pèse 10g de ce produit dans 100ml d'eau distillée.

- **Préparation de l'extrait de plante :**

Une masse de 1mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1ml de méthanol pour obtenir la solution deux.

Procédure

Mélanger 50 μ L de l'extrait de plante (Solution 2) avec 130 μ L de méthanol (MeOH), et 10 μ L de la solution une (CH_3COOK) et 10 μ L Chlorure d'aluminium (AlCl_3). Laisser reposer pendant 40 minutes, puis effectuer la lecture à 415 nm. Un blanc est préparé en remplaçant les réactifs par du méthanol, soit 50 μ L d'extrait et 150 μ L de méthanol.

2.5. Les activités biologiques in vitro

➤ Préparation de l'échantillon

La préparation de l'échantillon d'extrait hydroalcoolique a débuté par la pesée de 4 mg d'extrait à l'aide d'une balance analytique. La quantité pesée a ensuite été dissoute dans 1 ml de méthanol (MeOH) dans un tube Eppendorf. La solution obtenue a été soumise à une agitation par ultrasons jusqu'à homogénéisation complète.

À partir de cette solution mère, six dilutions ont été préparées conformément à l'équation (01), en ajoutant 0,5 ml de méthanol à 0,5 ml de la solution précédente dans des tubes Eppendorf de 1 ml, selon une méthode de dilution serielle.

Equation 01 : $\left(\frac{1}{2}\right)^n$, n : nombre de dilution

Cette équation représente une dilution serielle au facteur 2 (dilution au demi). Cela signifie que chaque dilution est 2 fois moins concentrée que la précédente.

Par exemple :

$n = 0$: concentration initiale (solution mère), soit $\left(\frac{1}{2}\right)^0 = 1 \rightarrow 100\%$ de la concentration initiale.

$n = 1$: $\left(\frac{1}{2}\right)^1 = \frac{1}{2} \rightarrow 50\%$ de la concentration initiale.



Figure 24 : Les différents étapes suivies pour la préparation de l'échantillon.

Remarque :

• Avant dilution :

- Le tube n°01 contient 1 ml de la solution mère de l'extrait, à une concentration initiale
- Les six autres tubes (n°02 à n°07) sont préremplis avec 0,5 ml de méthanol (MeOH).

• Après dilution :

- Une série de dilutions successives a été réalisée en transférant 0,5 ml de la solution d'un tube au suivant, en le mélangeant à 0,5 ml de MeOH. Ainsi, les tubes n°01 à n°06 contiennent chacun 0,5 ml de solution diluée, avec des concentrations décroissantes selon un facteur de dilution de 1/2 à chaque étape.

- Le tube final (n°07) contient un volume total de 1 ml, avec une concentration finale de

$$C = \left(\frac{1}{2}\right)^6 = \frac{1}{64} \text{ par rapport à la solution mère.}$$

Tableau 6 : les différentes concentrations des dilutions des extraits par rapport à la concentration initiale.

Les tubes	01	02	03	04	05	06	07
Les concentration (mg/ml)	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625

2.5.1. Évaluation de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes spectrophotométriques de détermination de l'activité antioxydante des extraits de plantes. Ces techniques, généralement simples, rapides et peu coûteuses, reposent sur des réactions chimiques standardisées. Dans le cadre de notre étude, plusieurs tests ont été utilisés, notamment :

- Le test du 2,2-diphényl picrylhydrazyl (DPPH) ;
- Le test de l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS) ;
- Le test utilisant le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) = ferric reducing antioxidant power.

Les mesures d'absorbance liées aux activités biologiques ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits de marque PerkinElmer (USA), couplé au logiciel EnSpire. Ces analyses ont été effectuées au sein du laboratoire de pharmacologie et toxicologie du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine.

A. Le test du DPPH

➤ Principe

Le DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un substrat couramment utilisé pour évaluer l'activité antioxydante, en raison de sa stabilité et de la simplicité de la méthode. Ce test repose sur la capacité des antioxydants à réduire le radical DPPH[•], ce qui entraîne un changement de couleur de la solution, du violet au jaune. On peut suivre cette transformation à l'aide d'un spectrophotomètre, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm qui indique une forte activité antiradicalaire (**Ipona et al., 2023**) (**Blois , 1958**).

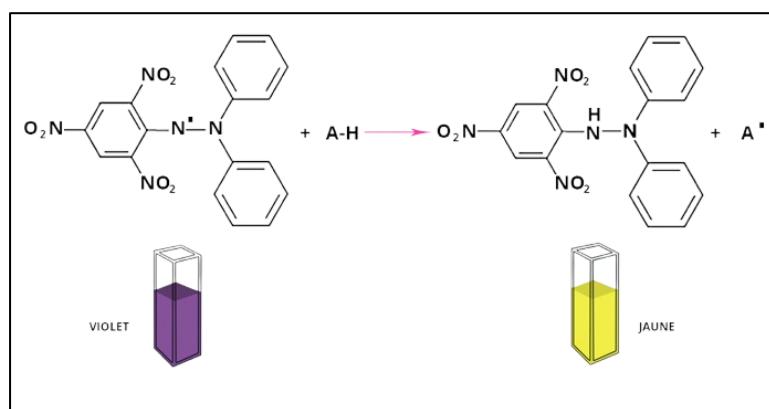


Figure 25 : Transformation du radical DPPH[•] en DPPH. (Site web).

- Mode opératoire
- Préparation de la DPPH

Une quantité de 6 mg de DPPH est dissoute dans 100 ml de méthanol. La solution obtenue est conservée à une température de -97,5°C, à l'abri de la lumière, afin de préserver la stabilité du radical libre. Avant utilisation, l'absorbance de la solution de DPPH est ajustée à 0,5 à une longueur d'onde de 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

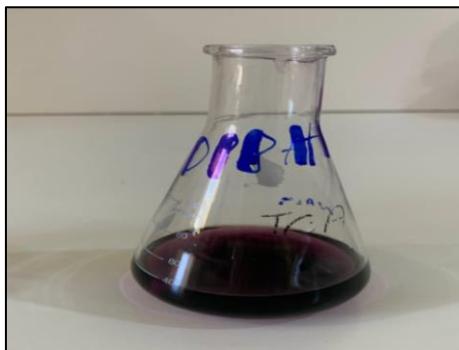


Figure 26 : solution du DPPH.

- Procédure

Dans une microplaque à 96 puits, chaque puits d'un volume total de 200 µL reçoit 40 µL de différentes concentrations de l'échantillon à tester, auxquels sont ajoutés 160 µL d'une solution méthanolique de DPPH. Un contrôle négatif est préparé en mélangeant 160 µL de la solution de DPPH avec 40 µL de méthanol pur. Toutes les conditions sont réalisées en triplicat. La microplaque est ensuite incubée à température ambiante, à l'obscurité, pendant 30 minutes avant la lecture de l'absorbance à 517 nm.

Le trolox et l'acide ascorbique sont utilisés comme standards antioxydants.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$DPPH \text{ (%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Acontrôle : est l'absorbance de la réaction sans extrait (du blanc).

Aéchantillon : est l'absorbance de la réaction après avoir ajouté l'extrait.

B. Le test de l'ABTS

- Principe

Le radical cationique ABTS⁺ est généré par l'oxydation de la molécule ABTS, suite à l'extraction d'un électron au niveau de l'un de ses atomes d'azote par le persulfate de potassium. En présence de composés antioxydants agissant comme donneurs de protons, ce radical, caractérisé par une coloration bleu-vert, est réduit en une forme incolore, notée ABTS⁺ (figure 27). La diminution de l'absorbance mesurée à 734 nm reflète alors l'efficacité de l'extrait à neutraliser les espèces radicalaires, et permet d'évaluer son potentiel antioxydant (Re et al., 1999).

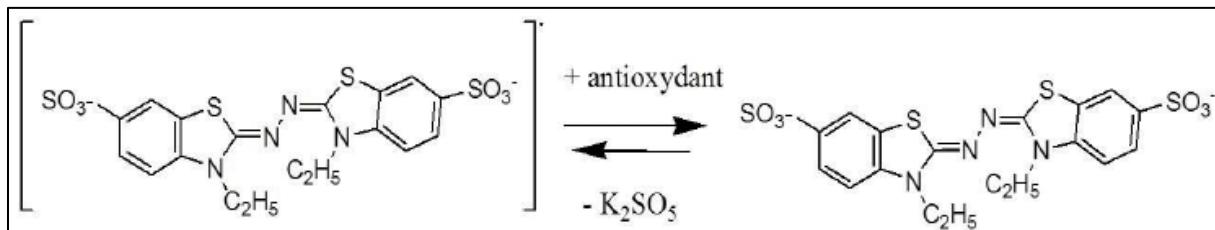


Figure 27 : Formation et piégeage du radical ABTS⁺ par un antioxydant.

➤ Protocole

L'activité de l'ABTS est déterminée par la méthode de (Re et al., 1999) avec une légère modification.

Pour évaluer l'activité antioxydante par la méthode ABTS nous suivons les étapes suivantes :

- Préparation du radical cationique ABTS^{•+} : dissoudre 19,2 mg d'ABTS (7 mM) dans 5 ml d'eau distillée et mélanger avec une solution de 3,3 mg de persulfate de potassium (K₂S₂O₈) (2,45 mM) dans 5 ml d'eau distillée.
- Incuber le mélange à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 heures afin de permettre la formation du radical. La solution obtenue est ensuite ajustée à une absorbance de 0,700± 0,020 à 734 nm à l'aide d'éthanol ou d'eau distillée.
- Dans une microplaquette à 96 puits, chaque puits d'un volume total de 200 µL, on mélange 160 µL de cette solution de ABTS^{•+} avec 40 µL d'un extrait à teste, puis on laisse incuber pendant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance est ensuite mesurée à 734 nm dans le spectromètre de microplaquette.

Le trolox et l'acide ascorbique sont utilisés comme standards antioxydants.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$ABTS (\%) = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Acontrôle : est l'absorbance de la réaction sans extrait (du blanc).

Aéchantillon: est l'absorbance de la réaction après avoir ajouté l'extrait.

C. Le test de FRAP

➤ Principe

La méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) permet d'évaluer le pouvoir antioxydant des extraits végétaux en mesurant leur capacité à réduire les ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}). Cette réduction provoque une coloration bleu-vert, mesurable à 700 nm par spectrophotométrie. Le système FeCl_3 (chlorure ferrique) / $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (ferricyanure de potassium) rend la méthode sensible et adaptée à une estimation semi-quantitative des composés antioxydants (**Addab et al., 2020**).

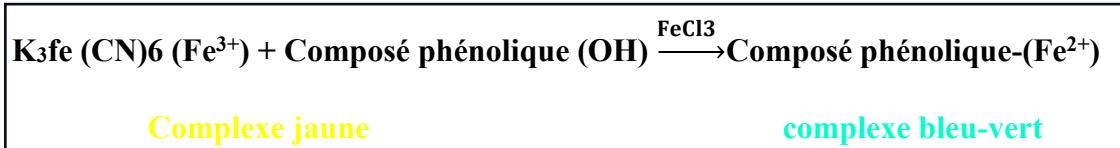


Figure 28 : Réduction de fer (III) en fer (II).

➤ Protocole

L'évaluation du pouvoir antioxydant réducteur, selon la méthode de Oyaizu (**Oyaizu, 1986**) avec une légère modification, commence par la préparation des réactifs :

- Le tampon phosphate buffer est ajusté à un pH de 6,6.
- Le ferricyanure de potassium ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) est préparé à une concentration de 1 %, soit 1 g dissous dans 100 ml d'eau distillée.
- L'acide tri-chloro-acide acétique (TCA) est préparé à 10 %, en dissolvant 1 g de TCA dans 10 ml d'eau distillée.
- Le chlorure ferrique (FeCl_3) est préparé à 0,1 %, soit 0,1 g dans 100 ml d'eau distillée.

Pour le test, dans des microplaques à 96 puits, on verse dans chaque puits un mélange composé de 10 μl d'extrait à différentes concentrations, 40 μl de tampon phosphate (pH 6,6) et 50 μl de ferricyanure de potassium (1 %). Ce mélange est ensuite incubé dans une étuve à 50 °C pendant 20 minutes afin de permettre la réduction du ferricyanure.

-Après incubation, ajouter dans chaque puit 50 µl d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 %, suivis de 40 µl d'eau distillée pour diluer le mélange, puis de 10 µl de chlorure ferrique (FeCl₃) à 0,1 % afin de révéler la couleur formée par le complexe ferreux. Un blanc est préparé dans le dernier puits selon la même procédure, à l'exception de l'extrait, qui est remplacé par du méthanol (MeOH). Dont l'intensité est mesurée à 700 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques, une augmentation de l'absorbance reflète une meilleure capacité réductrice de l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en A_{0,5} (µg/ml), correspondant à la concentration de l'échantillon induisant une absorbance de 0,50. Les standards utilisés dans les mêmes conditions expérimentales sont l'acide ascorbique et le trolox.

2.5.2. Les activités enzymatiques

2.5.2.1. Évaluation de l'Activité Antidiabétique

L'activité antidiabétique de l'extraits de feuilles de *Ginkgo biloba* L a été évaluée en utilisant la méthode d'inhibition de l'enzyme l'alpha-amylase.

A. Principe

L'inhibition de l'α-amylase a été évaluée selon la méthode colorimétrique à l'iode/iodure de potassium.

Le principe repose sur la capacité de l'α-amylase à hydrolyser l'amidon en sucres réducteurs (maltose, glucose). L'amidon non hydrolysé forme un complexe bleu avec l'iode, mesurable par spectrophotométrie à 630 nm (**Yang et al., 2012**).

B. Protocol

L'activité inhibitrice de l'alpha-amylase a été déterminée par la méthode de Zengin (**Zengin et al., 2014**) avec quelques modifications.

Des mélanges réactionnels ont été préparés dans une microplaques à 96 trous, en combinant 50 µL d'α-amylase (1 U) avec 25 µL de solutions d'extrait à différentes concentrations. L'ensemble a été incubé pendant 10 minutes à 37 °C afin de permettre l'interaction entre l'enzyme et les extraits. La réaction enzymatique a ensuite été initiée par l'ajout de 50 µL d'une solution d'amidon à 0,1 %. Les mélanges ont été incubés une seconde fois à 37 °C pendant 10 minutes.

La réaction a été arrêtée par l'ajout de 25 μL d'acide chlorhydrique (HCl, 1 M), suivie de l'ajout de 100 μL d'iodure de potassium (IKI).

Parallèlement, des blancs ont été préparés pour chaque concentration d'extrait. Ces blancs contiennent l'extrait à la concentration correspondante, la solution d'amidon, l'acide chlorhydrique et l'iodure de potassium, mais ne contiennent pas d'enzyme.

Le standard utilisé : Acarbose.

La lecture de l'absorbance de l'échantillon et du blanc a été réalisée à 630 nm.

Calcul de pourcentage d'inhibition :

$$\%INH = 1 - \left[\frac{(Ac - Ae) - (As - Ab)}{(Ac - Ae)} \right]$$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	As ₁	As ₁	As ₁	A _{b1}	As ₂	As ₂	As ₂	A _{b2}	As	As	As	A _b
B	As ₁	As ₁	As ₁	A _{b1}	As ₂	As ₂	As ₂	A _{b2}	As	As	As	A _b
C	As ₁	As ₁	As ₁	A _{b1}	As ₂	As ₂	As ₂	A _{b2}	As	As	As	A _b
D	As ₁	As ₁	As ₁	A _{b1}	As ₂	As ₂	As ₂	A _{b2}	As	As	As	A _b
E	As ₁	As ₁	As ₁	A _{b1}	As ₂	As ₂	As ₂	A _{b2}	As	As	As	A _b
F	As ₁	As ₁	As ₁	A _{b1}	As ₂	As ₂	As ₂	A _{b2}	As	As	As	A _b
G	As ₁	As ₁	As ₁	A _{b1}	As ₂	As ₂	As ₂	A _{b2}	As	As	As	A _b
H	Ae	Ae	Ae	Ae	Ae	Ae	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac

Figure 29 : Récapitulatif des différentes solutions préparées.

Ac=Absorbance [Amidon + IKI + HCl + solvant d'extrait + vol tampon Enzyme].

Ae=Absorbance [Enzyme + Amidon + IKI + HCl + vol solvant d'extrait].

As=Absorbance [Enzyme + Extrait + Amidon + IKI + HCl].

Ab=Absorbance [Extrait + IKI +125 μL tampon].

2.5.3. Evaluation de l'activité antifongique

Dans le cadre de notre étude portant sur les propriétés antifongiques des extraits de *Ginkgo biloba L.*, nous avons retenu une seule souche fongique comme modèle biologique. Il s'agit de *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (FOL), qui a été mise à notre disposition par le laboratoire de mycologie du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt).

➤ ***Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (FOL)***

FOL, abréviation de *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, est un champignon pathogène responsable du flétrissement vasculaire de la tomate, une maladie grave affectant cette culture. Provoquant le jaunissement, le flétrissement et la mort des plantes. Dans le cadre de la lutte biologique, l'étude évalue l'efficacité de certains champignons producteurs d'enzymes lytiques capables d'altérer les structures cellulaires du FOL pour en réduire la propagation et la sévérité dans le sol et la rhizosphère des plants de tomate (**De Cal et al., 1995**).

L'évaluation de l'activité inhibitrice de l'extrait EHAGB vis-à-vis de la croissance mycéienne des agents phytopathogènes a été réalisée par la mesure de la croissance radiale des champignons sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar) supplémenté avec l'extrait étudié.

A. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) constitue un substrat favorable au développement des champignons phytopathogènes.

Pour la préparation de 1300 ml de milieu, les quantités suivantes sont requises :260 g de pommes de terre, 26 g de glucose, 26 g d'agar-agar.

La préparation s'effectue selon les étapes suivantes :

- ✓ Une suspension est préparée en plaçant 260 g de pommes de terre dans 800 ml d'eau distillée. Le mélange est chauffé jusqu'à ébullition à une température de 100 °C.
- ✓ Le jus obtenu est ensuite filtré afin d'éliminer les particules solides, puis complété avec de l'eau distillée pour atteindre un volume final de 1300 ml.
- ✓ Ce filtrat est porté à ébullition sous agitation continue. Le glucose et l'agar sont incorporés progressivement afin d'assurer une dissolution homogène des composants.
- ✓ Le milieu ainsi obtenu est réparti dans des tubes ou flacons de culture.
- ✓ Enfin, la stérilisation est effectuée par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.



Figure 30 : Préparation de milieux de culture PDA.

B. Préparation d'extraits végétal

Nous avons préparé trois concentrations différentes à partir EHAGB et le solvant de dilution a été le DMSO.

- Une concentration élevée de (30 mg/100 µl).
- Une concentration moyenne de (15 mg/100 µl).
- Une concentration faible de (7.5 mg/100 µl).

C. Procédure

La méthode à préparer les boîtes de pétri est de manière suivante : après la solidification du milieu gélosé (chaque boîte de pétri contient 20 ml), un disque de mycélium de 6mm de diamètre est placé de manière aseptique au centre d'une boîte de pétri de 8cm de diamètre. Ensuite, 25 µl des différentes concentrations d'extrait ont été ajoutés directement dans les boîtes prévues. Pour le témoin positif (FOL-), nous avons ajouté 25µl de DMSO sur le disque de champignon, en revanche, pour le témoin négatif (FOL+) contient à la fois le champignon et un fongicide. Chaque concentration est testée trois fois. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées pendant 2 jours (48 heures) à 25c°.

D. Lecture des résultats

Après l'incubation, on a mesuré le diamètre des zones d'inhibition autour du disque mycélien dans les boîtes contenant les différents extraits et le diamètre moyen de croissance du champignon (exprimé en centimètres) pour chaque concentration testée. L'efficacité antifongique de chaque extrait a été évaluée en calculant le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, en comparaison avec le diamètre moyen des colonies fongiques cultivées en l'absence d'extrait (témoin). L'activité inhibitrice a ainsi été exprimée en pourcentage, conformément à la formule suivante :

$$TI\% = \frac{T - TR}{T} \times 100$$

TI : taux d'inhibition.

T : C'est la croissance diamétrale du champignon dans le groupe témoin (sans traitement ou avec un contrôle).

TR : la croissance diamétrale du champignon dans le groupe traité avec l'extrait.

2.5.4. Activité Antibactérienne

Le principe d'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion par disques des produits de synthèse consiste à réaliser une culture microbienne dans le milieu de culture approprié (La gélose de Muller –Hinton), en présence de disques imbibés des produits à tester solubilisés dans un solvant. Si ces derniers ont une activité antimicrobienne, on observera une zone d'inhibition autour du disque due à la diffusion des échantillons. Le support microbien est composé de souches ATCC (American Type Culture Collection) (**Bauer et al., 1996**).

Préparation de l'extrait

On a préparé une solution mère de l'extrait EHA comme suit : (100 mg/ml), le solvant a été le DMSO. Ensuite, il a été dilué 3 fois (50mg, 25mg et 12.5mg).

Souches de test

Cette étude porte sur deux souches bactériennes pathogènes de référence : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Gram positif, Gram négatif).

❖ Procédure

A. Repiquage des espèces bactériennes

Dans des conditions stériles, une colonie isolée et représentative de la souche a été prélevée à l'aide d'une pipette pasteur stérile ou d'un ensemenceur. Elle a ensuite été ensemencée par striation sur une boîte de pétri contenant un milieu de culture, on les a cultivés après dans l'étuve à 37°C pendant 24h. Si les nouvelles cultures obtenues sont représentatives de celle reçues initialement, il est possible de les utiliser pour la préparation de l'inoculum.

B. Préparation des milieux de culture

La gélose de Muller-Hinton (milieu spécifique pour les bactéries) prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de Pétri stériles. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante avant leur emploi.

C. Ensemencement

Les boîtes de Pétri préalablement coulées sont ensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile ; l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.

D. Préparation des disques

Des disques de 6 mm de diamètre ont été préparés à partir de papier Whatman n°3, puis stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes. Après stérilisation, ont été imprégnés avec différentes concentrations d'un extrait (100, 50, 25 et 12.5 mg). À l'aide d'une pince stérile, ils ont été déposés sur la surface d'un milieu gélosé Mueller-Hinton préalablement ensemencé. Après incubées à 37 °C pendant 18-24 heures.

L'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant, le diamètre des zones d'inhibition. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux du DMSO (contrôle négatif), ainsi qu'à ceux d'un antibiotique de référence (contrôle positif).

Chapitre 03 :
Résultats et Discussion

1-Screening phytochimique

L'étude phytochimique menée sur *Ginkgo biloba L.* a permis d'identifier divers composés appartenant aux métabolites secondaires. Leur mise en évidence repose sur des méthodes qualitatives précises, combinant des réactions de solubilisation, de précipitation et de coloration appliquées à l'extrait hydroalcoolique. Les données présentées dans le tableau résultent de ces analyses, réalisées conformément aux procédures décrites antérieurement.

Les résultats obtenus sont évalués comme suit :

Tableau 7 : Les résultats du screening phytochimique de *Ginkgo biloba L.*

Métabolites secondaires	Observation	Résultats
Phénols		+
Flavonoïdes		+
Tanins		+
Saponines		-

- (+) : Réaction positive.
- (-) : Réaction négative.

D'après les résultats obtenus par le criblage phytochimique effectué sur l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *Ginkgo biloba* L. a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs groupes de composés chimiques, tels que les flavonoïdes, les tanins et les polyphénols (**Tableau 7**). En revanche, les saponosides ont été absents uniquement dans l'extrait hydroalcoolique, suggérant une influence du solvant d'extraction sur la composition phytochimique.

2.Résultats des dosages des polyphénols et des flavonoïdes

L'étude quantitative de *Ginkgo biloba* L a été faite par deux dosages. Les résultats sont présentés dans le (**tableau 08**).

Tableau 08 : La teneur en composés phénoliques, flavonoïdes.

	Polyphénols (µg EGA/mg d'extrait)	Flavonoïdes (µg QE/mg d'extrait)
Extrait	139,75 ± 7,83	40,55 ± 1,17

2.1. Résultats de dosage des polyphénols

Afin de déterminer la teneur totale en polyphénols de la plante *Ginkgo biloba*, un dosage a été réalisé en utilisant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, la figure (**31**) présente la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (**08**) et la figure (**32**), et sont exprimés en microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait), en utilisant l'équation suivante :
$$(y = 0,0034x + 0,1044)$$
 avec $R^2 = 0,9972$.

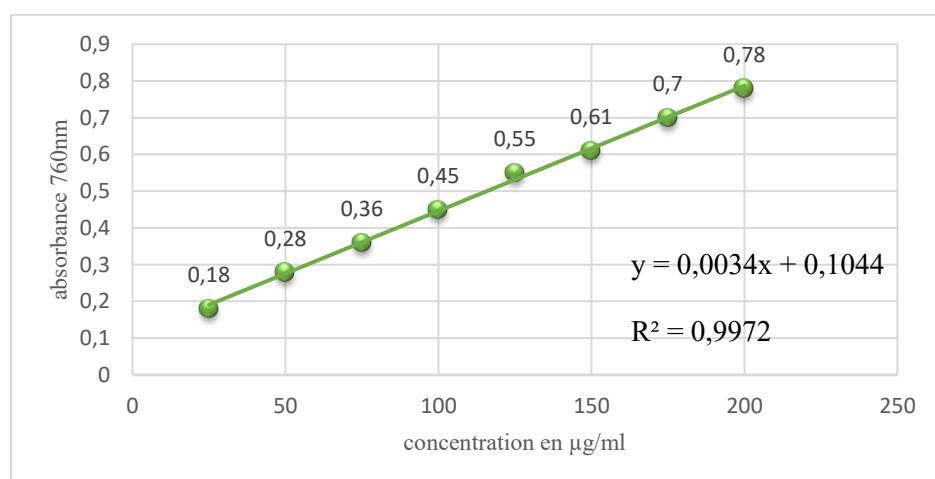


Figure 31. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

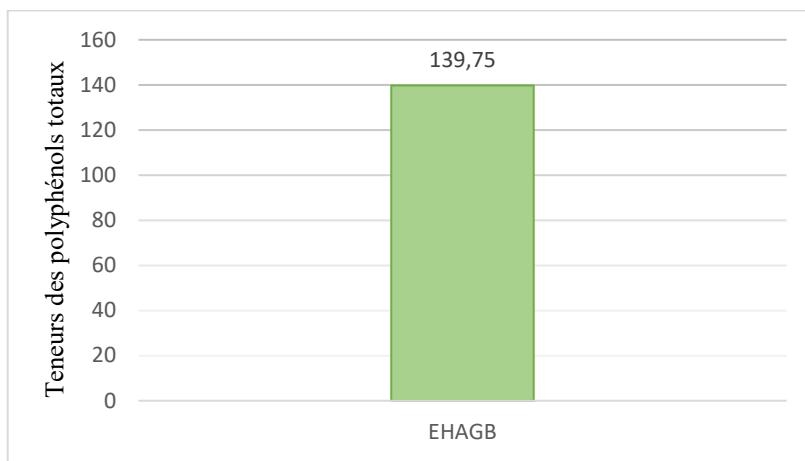


Figure 32. Evaluation des polyphénols totaux de l'extrait de *Ginkgo biloba* L.

La teneur totale en polyphénols de notre extrait hydroalcoolique de *Ginkgo biloba* a été estimée à $139,75 \pm 7,83$ µg EGA/mg d'extrait, ce qui révèle une richesse importante en composés phénoliques. Cette valeur est inférieure à celle rapportée par **Mortazavi et al.**, (2021), qui ont obtenu $167,79 \pm 5,04$ µg EAG/mg à partir d'un extrait méthanolique, suggérant que le méthanol pourrait être un solvant plus efficace pour l'extraction de ces composés. En revanche, notre résultat dépasse largement ceux d'un autre auteur **Koczka et al.**, (2016) ayant utilisé l'éthanol comme solvant, avec des teneurs variantes entre $34 \pm 0,24$ et $66,86$ µg /mg, mettant en évidence l'impact significatif du choix du solvant sur le rendement en polyphénols.

2.2. Résultats de dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes totaux a été réalisée selon la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Cette méthode repose sur la formation d'un complexe stable entre les flavonoïdes et les ions aluminium, caractérisé par une absorption maximale à une longueur d'onde de 430 nm.

La quercétine a été utilisée comme étalon de référence pour l'établissement de la courbe d'étalonnage. La relation entre l'absorbance mesurée et la concentration en quercétine a été exprimée par l'équation linéaire suivante : $Y = 0,0071x + 0,0274$ avec $R^2 = 0,9985$ (figure (33)).

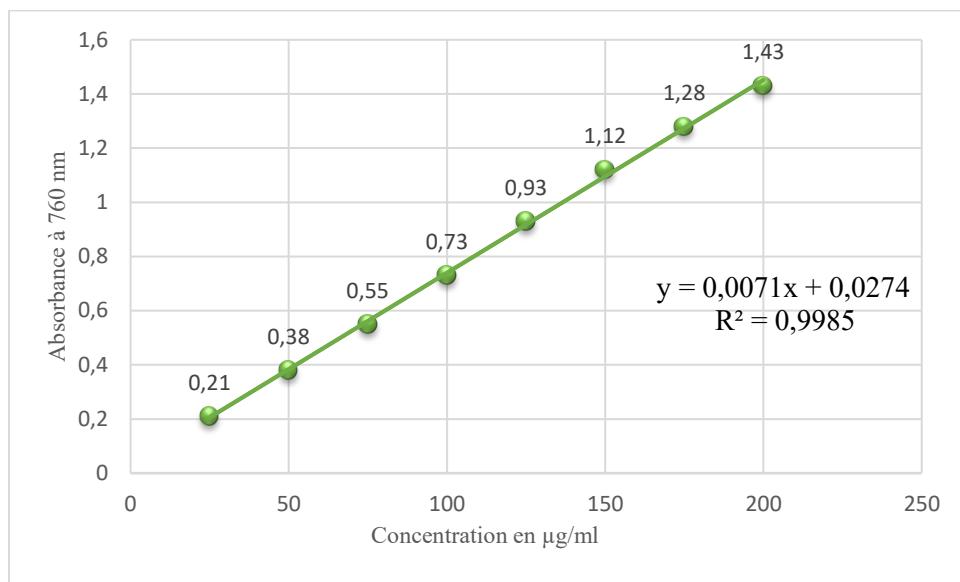


Figure 33 : Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en µg d'équivalent de la quercétine par mg de poids sec de l'extrait (µg QE/mg).

Les résultats sont illustrés dans la figure au-dessous.

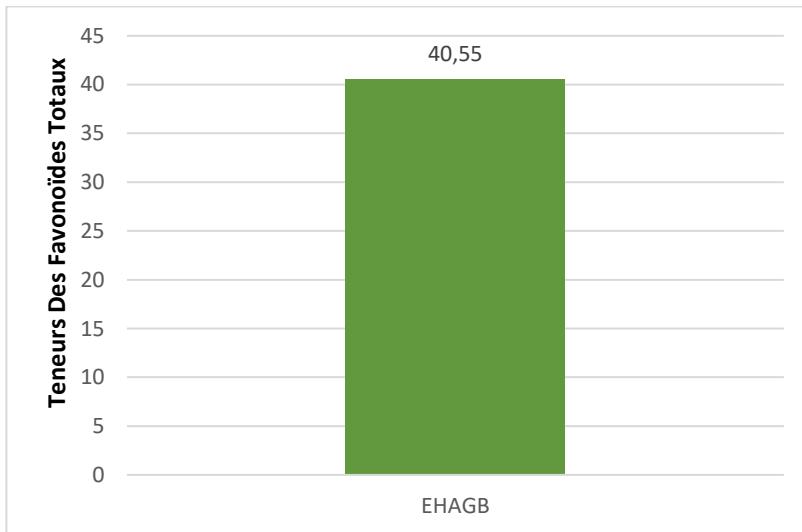


Figure 34 : Evaluation des flavonoïdes totaux de l'extrait de *Ginkgo biloba*.

La teneur totale en flavonoïdes de notre extrait hydroalcoolique de *Ginkgo biloba* a été estimée à $40,55 \pm 1,17$ µg QE/mg, ce qui est relativement inférieure à celle rapportée par **Mortazavi et al., (2021)**, dont l'extrait éthanolique présente une concentration de 93.21 ± 1.41 µg/ml. Toutefois, il est important de noter que les unités de mesure diffèrent, ce qui peut influencer directement la comparaison. En revanche, les résultats obtenus par **Lalit M. Tewari, (2017)**

indiquent une teneur en flavonoïdes de $257,04 \pm 0,36 \mu\text{g QE/mg}$ dans l'extrait méthanolique des feuilles, une valeur significativement plus élevée que celle de notre étude. Ces différences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, notamment le solvant utilisé pour l'extraction, la partie de la plante analysée, ainsi que les conditions environnementales et les méthodes analytiques employées.

Par ailleurs, la variation des concentrations totales en polyphénols et en flavonoïdes chez *Ginkgo biloba* résulte de l'interaction complexe de plusieurs facteurs, notamment les caractéristiques génétiques, le stade phénologique au moment de la récolte, les conditions environnementales (telles que l'intensité lumineuse, la nature du sol et les stress abiotiques), ainsi que des paramètres techniques liés au protocole d'extraction, en particulier la méthode employée et le type de solvant utilisé.

3. Les activités antioxydantes

Les extraits issus de diverses plantes constituent des sources potentielles de composés chimiques naturels dotés d'activités antioxydantes. C'est dans ce contexte que nous avons évalué l'activité antioxydante de l'extrait de *Ginkgo biloba* en ayant recours à trois méthodes différentes.

3.1. Activité antiradicalaire DPPH

L'activité antiradicalaire de l'extrait a été évaluée à l'aide du test DPPH. L'essai a été réalisé par spectrophotométrie à 517 nm. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux des antioxydants de référence, Trolox et Acide ascorbique, dans le but de situer l'efficacité relative de l'extrait étudié. Les résultats sont présentés au-dessous :

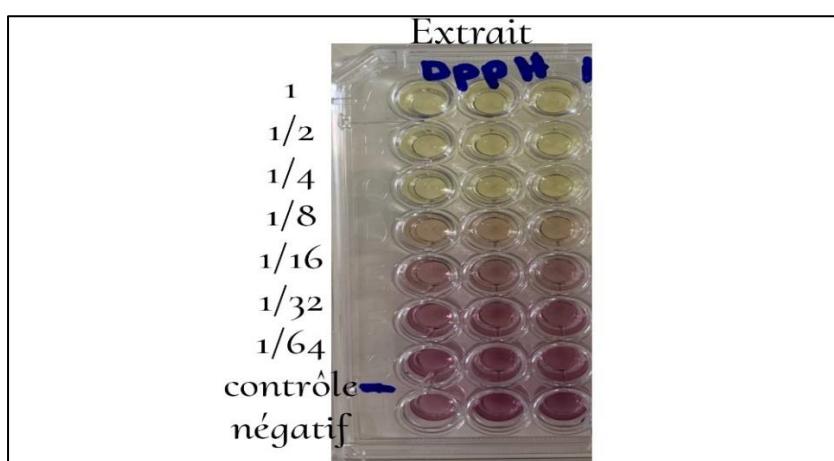
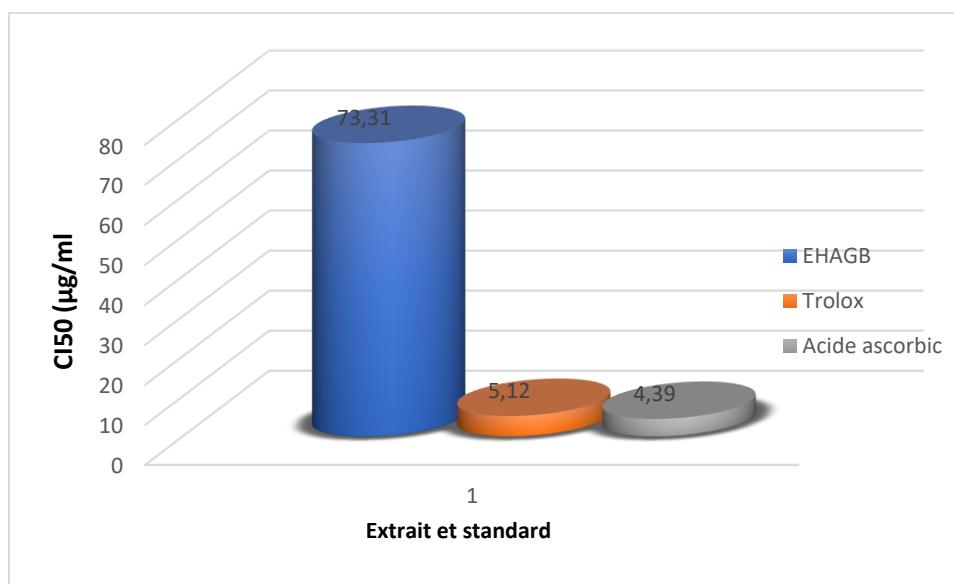


Figure 35 : résultats du test DPPH sur microplaques.

Tableau 9 : Inhibition du radical DPPH par l'extrait.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$) Extrait et Standard	% inhibition							IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	400 μg	800 μg	
EHAGB	3,74 \pm 1,85	15,80 \pm 0,94	37,32 \pm 1,49	66,84 \pm 0,32	85,85 \pm 0,24	83,77 \pm 1,36	74,00 \pm 9,53	73,31 \pm 0,94
	0.78125 μg	1.5625 μg	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	
Trolox	6.42 \pm 0.91	13.33 \pm 2.14	30.19 \pm 0.67	61.48 \pm 2.98	87.16 \pm 0.28	88.46 \pm 0.11	87.72 \pm 0.47	5.12 \pm 0.21
Acide ascorbique	0.31 \pm 1.02	12.90 \pm 0.28	29.69 \pm 0.39	76.67 \pm 0.37	84.94 \pm 0.84	87.78 \pm 0.49	86.36 \pm 0.21	4.39 \pm 0.01

**Figure 36** : Valeurs IC50 du test DPPH.

Selon les résultats obtenus par la méthode DPPH, l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *Ginkgo biloba* (EHAGB) présente une activité antiradicalaire relativement faible, avec une valeur d'IC50 de $73,31 \pm 0,94 \mu\text{g/ml}$. Cette valeur est nettement plus élevée que celles des antioxydants de référence, à savoir le Trolox ($5,12 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$) et l'acide ascorbique ($4,39 \pm$

0,01 µg/ml), indiquant une efficacité antioxydante moindre de l'extrait par rapport aux standards.

3.2. Activité de piégeage du cation radical ABTS•+

La détermination de différentes concentrations inhibitrices de l'extrait comparées aux standards Trolox et acide ascorbique est illustrée dans le tableau et la figure ci-dessous :

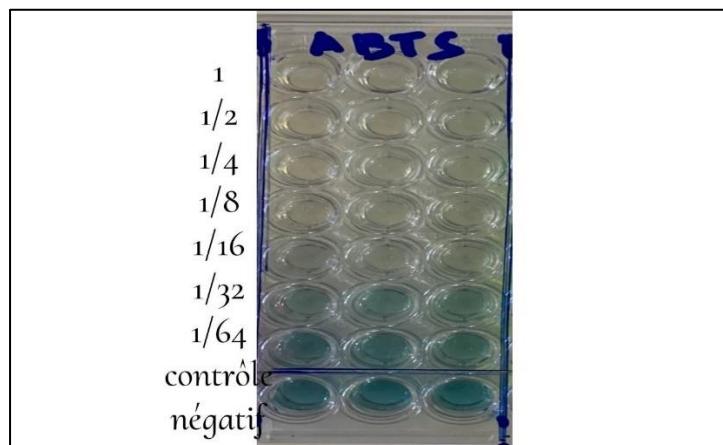


Figure 37 : résultats du test ABTS sur microplaqué.

Tableau 10 : Inhibition du cation radical ABTS.

Concentration (µg/ml) Extrait et Standard	% inhibition							IC50 (µg/ml)
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
EHAGB	26,13± 2,30	45,77±2, 22	67,71± 3,43	90,33± 2,50	93,46± 0,22	93,50± 0,25	91,72± 2,37	32,44±1,32
	0.7815 µg	1.5625 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	
Trolox	14.74± 0.37	26.15±0. 65	51.70± 1.51	89.72± 0.67	92.89± 0.19	92.89± 0.19	91.84± 1.19	3.21±0.06
Acide ascorbic	13.43± 0.82	28.76± 0.67	52.94± 0.94	93.21± 0.11	93.08± 0.19	92.40± 0.88	92.96± 0.11	3.04±0.05

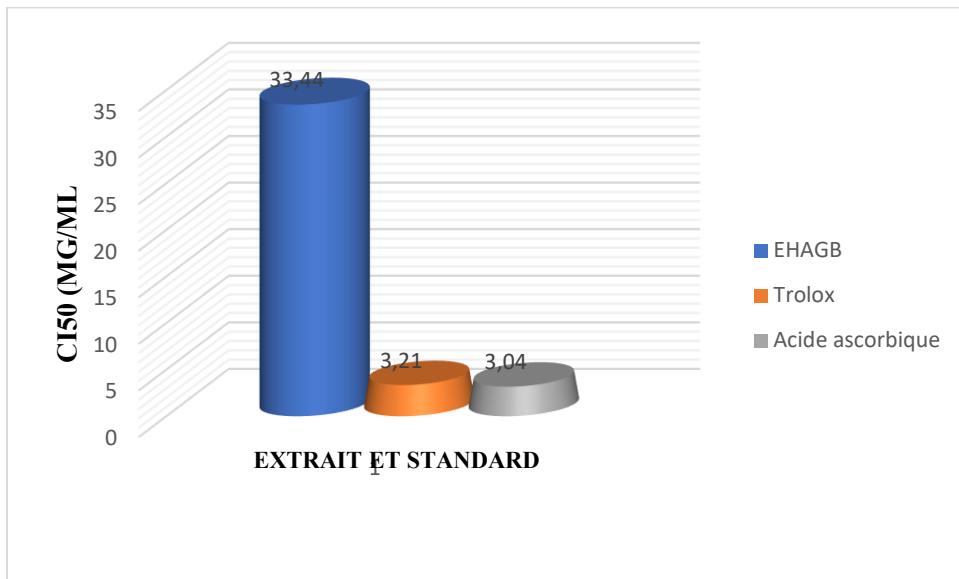


Figure 38 : Valeurs CI50 du test ABTS.

Les résultats du test ABTS ont révélé que l'EHAGB présente une activité radicalaire modérée ($IC50 : 32,44 \pm 1,32 \mu\text{g/ml}$) par rapport aux standards utilisés, à savoir le Trolox et l'acide ascorbique ($IC50 = 3,21 \pm 0,06$ et $IC50 = 3,04 \pm 0,05$ respectivement).

3.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Les valeurs $A_{0,5}$ ont été calculées puis comparées à celles des standards (acide Ascorbique et Trolox).

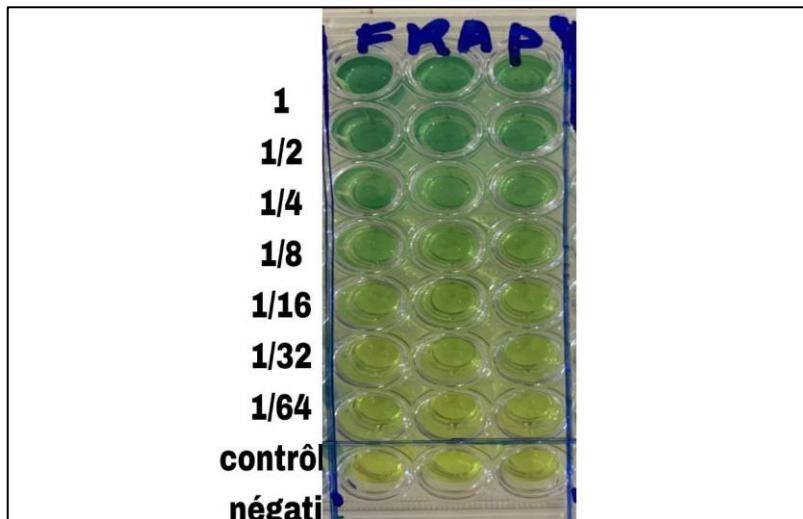
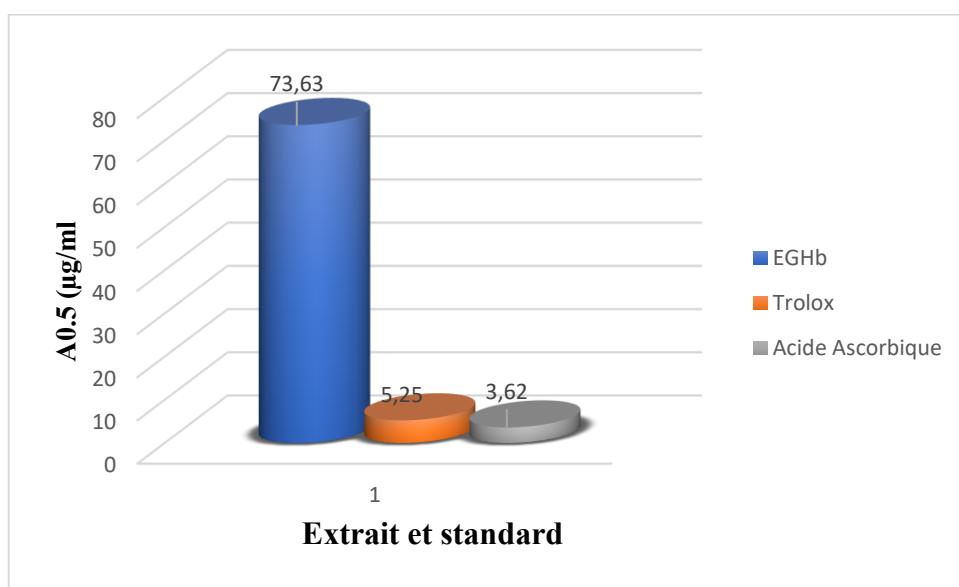


Figure 39 : résultats du test FRAP sur microplaque.

Tableau 11 : Réduction du fer par la méthode FRAP.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$) Extrait et Standard	Pouvoir réducteur							$A_{0,5}$ ($\mu\text{g/ml}$)
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	
EHAGB	0,11 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02	0,19 \pm 0,03	0,26 \pm 0,03	0,40 \pm 0,03	0,72 \pm 0,15	0,84 \pm 0,18	73,63 \pm 5,55
	0.0976 μg	0.195 μg	0.390 μg	0.781 μg	1.562 μg	3.125 μg	6.25 μg	
Trolox	0.07 \pm 0.00	0.08 \pm 0.00	0.09 \pm 0.01	0.13 \pm 0.00	0.19 \pm 0.02	0.28 \pm 0.05	0.60 \pm 0.04	5.25 \pm 0.20
Acide ascorbic	0.07 \pm 0.00	0.09 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02	0.47 \pm 0.03	0.79 \pm 0.09	3.62 \pm 0.29

**Figure 40 :** Valeurs $A_{0,5}$ du test FRAP.

Le changement de couleur observé sur la figure ainsi que l'augmentation de l'absorbance en fonction de la dose croissante de l'extrait, présentée dans le tableau, démontrent que l'extrait EHAGB possède un certain pouvoir réducteur ($A_{0,5} = 73,63 \pm 5,55$). Cependant, ce pouvoir

reste nettement inférieur à celui des antioxydants de référence, reconnus pour leur efficacité, tels que le trolox ($A_{0,5} = 5,25 \pm 0,20$) et l'acide ascorbique ($A_{0,5} = 3,62 \pm 0,29$).

Nos résultats des tests précédents diffèrent de ceux rapportés dans la littérature concernant les extraits de feuilles de *Ginkgo biloba* analysés par d'autres chercheurs tels que :

L'étude de (**Devec et al., 2023**), portant sur l'extrait méthanolique des feuilles de *Ginkgo biloba* en Turquie, a montré des valeurs de CI50 pour les tests ABTS et DPPH plus élevées (173,78 µg/ml et >400 µg/ml respectivement) que celles obtenues dans nos expériences, qui sont de 73,31 µg/ml pour le test DPPH et de 32,44 µg/ml pour le test ABTS.

De même, l'étude de (**Klomsakul et al., 2022**), sur l'extrait hydroéthanolique a révélé une valeur de CI50 pour le test DPPH de $162,07 \pm 9,5$ µg/ml, également plus élevée que nos résultats.

Cela indique que notre extrait (EHAGB) possède une activité antioxydante plus puissante que les extraits méthanolique et hydroéthanolique mentionnés dans ces études.

Dans notre étude l'évaluation de test FRAP a révélé une valeur de $73,63 \pm 5,55$ µg/ml, nettement supérieure à celle rapportée par (**Kaur et al., 2012**), dont les valeurs variaient entre 18,1 et 41,7 mg Trolox/g. Cette différence souligne l'efficacité des conditions d'extraction utilisées dans cette étude pour concentrer les composés antioxydants.

Les résultats obtenus indiquent que notre extrait est riche en composés phénoliques, des molécules caractérisées par la présence de groupements hydroxyles, capables de donner des électrons et des atomes d'hydrogène (**Guddadarangavvanahally et al., 2008**). Le pouvoir réducteur observé est probablement attribuable à la présence de ces phénols (**Perumal, Klaus, 2007**), Cependant, (**More et al., 2021**) ont montré que l'activité antioxydante du *Ginkgo* est attribuable à sa teneur élevée en flavonoïdes et en terpénoïdes, des composés antioxydants puissants capables de neutraliser les effets néfastes des radicaux libres.

4. Activité Enzymatique

4.1. Evaluation de l'activité Antidiabétique

L'activité antidiabétique des différentes concentrations d'extraits EHAGB a été évaluée en mesurant leurs capacités à inhiber l'enzyme alpha-amylase.

- **Inhibition de l'alpha-amylase**

Dans cette étude, l'activité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase par l'extrait de *Ginkgo biloba* a été évaluée en déterminant les concentrations inhibitrices médianes (CI₅₀), en comparaison avec le standard acarbose. Cette évaluation repose sur la capacité des substances testées à inhiber l'action de l'enzyme. Les résultats sont présentés ci-dessous.

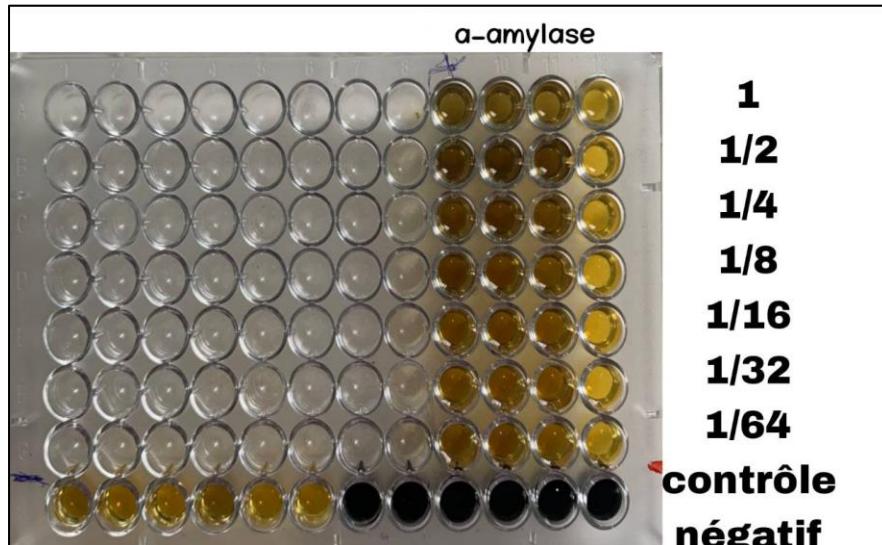


Figure 41 : résultats du l'activité inhibitrice de l'alpha-amylase sur microplaqué.

Tableau 12 : inhibition de alpha-amylase par l'extrait de *Ginkgo biloba*.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$) Extrait et Standard	% inhibition							IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	6,25 μg	12,5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	400 μg	
EHAGB	5,07 \pm 0,50	5,01 \pm 0,46	6,48 \pm 0,27	9,25 \pm 1,68	11,39 \pm 1,13	17,30 \pm 0,99	9,48 \pm 2,26	>400
	62,5 μg	125 μg	250 μg	500 μg	1000 μg	2000 μg	4000 μg	
Acarbose	7,76 \pm 0,17	8,08 \pm 0, 30	9,46 \pm 0,11	10,70 \pm 0,96	31,81 \pm 2,89	37,21 \pm 3,54	53,05 \pm 1,59	3650,93 \pm 10,70

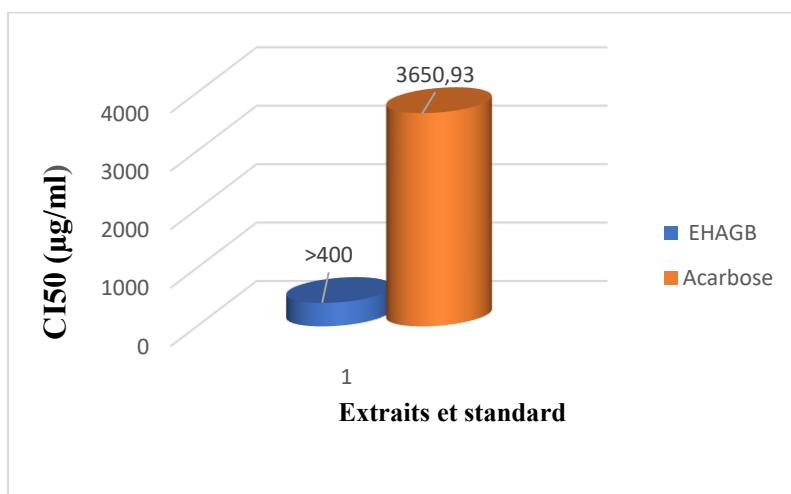


Figure 42 : Valeurs des IC_{50} du test d'inhibition de l' α -amylase pour l'extrait de *Ginkgo biloba*.

L'analyse des données révèle que l'extrait EHAGB exerce une inhibition enzymatique croissante en fonction de la concentration, atteignant un maximum de $17,03 \pm 0,99$ à $200 \mu\text{g}/\text{ml}$. Toutefois, une diminution de l'activité est observée à $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($9,48 \pm 2,26$), ce qui suggère une possible saturation de l'effet ou une dégradation des composés phénoliques. L' IC_{50} de cet extrait est $> 400 \mu\text{g}/\text{ml}$, ce qui indique une faible activité inhibitrice de l'alpha-amylase par rapport au standard, l'acarbose, qui montre une activité inhibitrice plus élevée ($IC_{50} = 3650,93 \pm 10,70 \mu\text{g}/\text{ml}$) et croissante avec la concentration, atteignant $53,05 \pm 1,59$ à $4000 \mu\text{g}$.

Da Silva *et al.*, 2009 ont montré que l'activité inhibitrice des extraits aqueux et éthanoliques de feuilles de *Ginkgo biloba* sur l'enzyme alpha-amylase varie en fonction de l'origine des feuilles (deux arbres mâles et deux femelles) ainsi que de la période de récolte (de juin à octobre), comme l'ont révélé les essais réalisés *in vitro*. Les extraits aqueux, généralement plus riches en composés phénoliques totaux, ont montré une capacité inhibitrice parfois supérieure à celle des extraits éthanoliques, bien que cette relation ne soit pas strictement linéaire. En revanche, nos travaux expérimentaux ont révélé une activité inhibitrice très faible de l'extrait hydroalcoolique vis-à-vis de cette même enzyme, suggérant que cet extrait ne constitue pas une source efficace d'inhibition de l'alpha-amylase, contrairement à ce qui a été observé dans l'étude de référence.

5. Evaluation de l'activité antifongique

L'activité antifongique de l'extrait hydroalcoolique de *Ginkgo biloba* a été étudiée afin d'évaluer son efficacité contre *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (FOL). Cette évaluation repose sur l'observation de la croissance mycélienne du pathogène sur un milieu PDA (Potato

Dextrose Agar) supplémenté en différentes concentrations de l'extrait (tableau 13 et les figures 44 ;45 et 46).

Tableau 13 : Taux d'inhibition et diamètre moyen des thalles exposés à l'extrait *Ginkgo biloba*.

Ginkgo biloba L.			
Souche fongique	Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici (FOL).		
Concentrations mg/ml	7.5	15	30
Diamètres moyens des thalles (cm)	1.86	1.73	1.73
%d'inhibition	25.5%	30.8%	30.8%

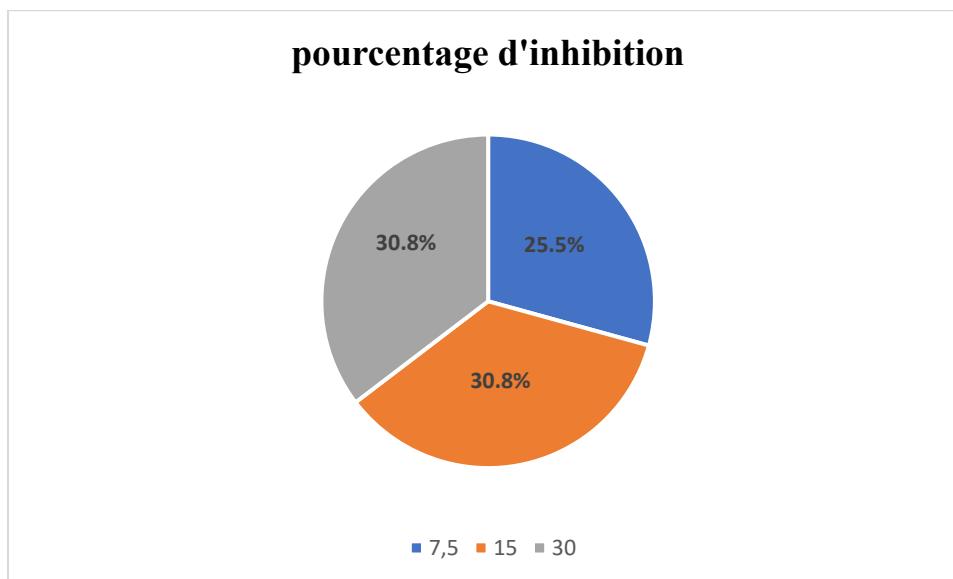


Figure.43. Taux d'inhibition des extraits de *Ginkgo biloba* sur le *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*.



Figure :44. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait hydroalcoolique (EHA7.5).



Figure :45. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait hydroalcoolique (EHA25).



Figure 46. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait hydroalcoolique (EHA50).

Les résultats présentés dans les figures ci-dessus montrent clairement que le pourcentage d'inhibition du champignon FOL augmente avec la concentration de l'extrait EHAGB entre 7,5mg/ml (25,5%) et 15mg/ml (30,8%) ce qui suggère une activité antifongique dose-dépendante. Cependant, entre 15mg/ml et 30mg/ml l'effet antifongique se stabilise à 30,8%. Malgré ces taux d'inhibition, il est à noter que l'activité antifongique de l'extrait EHAGB est faible contre le champignon FOL.

6. Evaluation de l'activité Antibactérienne

L'activité antibactérienne d'extrait hydroalcoolique a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion en milieu gélosé, en employant le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme solvant de dilution. Des disques imprégnés d'extrait ont été appliqués sur des géloses ensemencées avec deux souches bactériennes : *Escherichia coli* (E. coli) et *Staphylococcus aureus*. Après incubation, l'apparition de zones d'inhibition autour des disques indique l'efficacité antimicrobienne de l'extrait étudié.

On a utilisé le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme témoin négatif, c'est-à-dire pour évaluer l'absence d'effet antibactérien de cette substance sur les souches testées. Les résultats sont présentés dans le tableau et la figure ci-joints :

Tableau 14 : Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait sur les deux souches.

Extrait	Souche	Concentration (mg/ml)	Zone d'inhibition (mm)	Zone d'inhibition DMSO (mm)	Zones d'inhibition obtenue
EHAGB	<i>E. coli</i>	Solution mère 12,5 25 50	6 6 6 8	0	
/	Témoin De <i>E. coli</i>	/	16	0	
EHAGB	<i>S. aureus</i>	Solution mère 12,5 25 50	9 7 8 8	0	
/	Témoin Des. <i>aureus</i>	/	19	0	

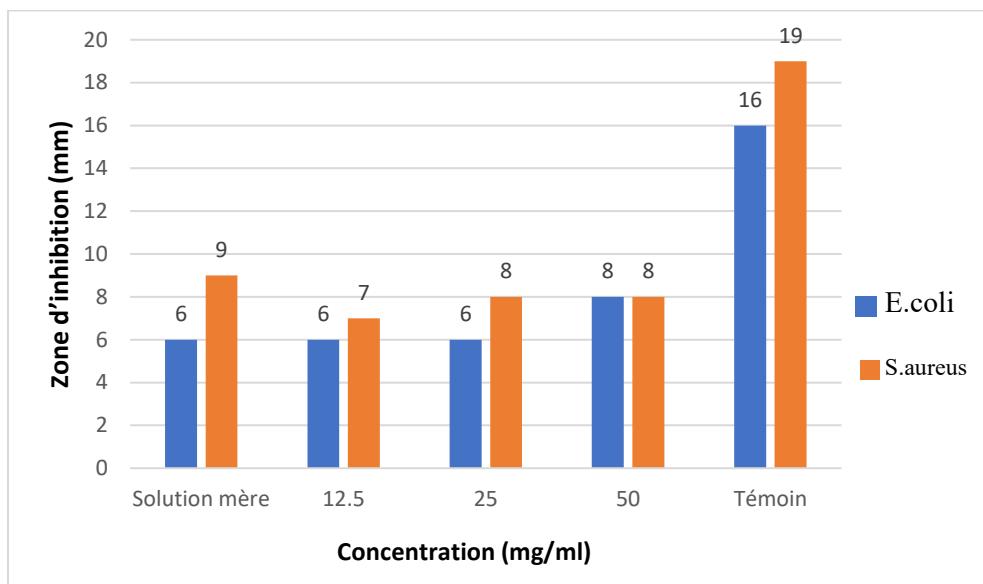


Figure 47 : Inhibition bactériennes selon la concentration de l'extrait EHAGB.

D'après les résultats donnés dans le tableau (15) et la figure (47) on observe que le diamètre de la zone d'inhibition varie en fonction de la souche bactérienne testée ainsi que de la concentration de l'extrait.

Les diamètres d'inhibition obtenus avec l'extrait EHAGB contre la souche *E. coli* sont nettement inférieurs à celui du témoin positif (16 mm). Les trois premières concentrations (solution mère, 12,5 et 25 mg/ml) montrent une faible activité constante (6 mm), une légère augmentation est observée à la concentration 50 mg/ml, atteignant un diamètre de (8 mm). De même, les diamètres d'inhibition obtenus avec l'extrait EHAGB contre la souche *S. aureus* sont également inférieurs à celui du témoin positif (19 mm). Une variation modérée des diamètres (entre 7 et 9 mm) suggère toutefois une sensibilité légèrement supérieure de *S. aureus* à l'extrait par rapport à *E. coli*.

En comparaison avec d'autres études telles que celle de (**Bouattou, 2021-2022**) qui a montré que *S. aureus* se révèle très sensible à l'extrait méthanolique de *Ginkgo biloba*, avec des diamètres d'inhibition (DI) allant de 15 mm à 19 mm, tandis qu'aucune sensibilité n'a été observée vis-à-vis d'*E. coli*. (**EL-Beltagi et Badawi, 2013**) On met également en évidence, dans leur étude que l'extrait méthanolique des feuilles de *Ginkgo biloba* possède un effet puissant contre la bactérie *S. aureus* (DI 10-15mm) et n'a montré aucun effet contre la bactérie à gram négatif *E. Coli*. (**Ibrahim, Nuhu, 2016**) Ont noté que l'extrait de *Ginkgo biloba* (EGb 761) est actif contre les bactéries *S.aureus* et *E.coli*, avec des zones d'inhibition de 24 mm et

26 mm respectivement et déterminent la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est de 15 mg/ml.

Les terpénoïdes trilactones et de glycosides flavonoïques pourraient être responsables de l'activité antimicrobienne (**Sati, Joshi, 2011**), leur faible concentration dans notre extrait hydroalcoolique de *Ginkgo biloba* (EHAGB) pourrait expliquer la faible activité antimicrobienne observée.

Conclusion

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales jouent un rôle essentiel en santé grâce à leurs propriétés thérapeutiques naturelles. Elles constituent également une source pour la découverte des nouvelles molécules, indispensables au développement de médicaments innovants.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à réaliser l'extraction par macération en utilisant un solvant hydroalcoolique des feuilles de *Ginkgo biloba* L. qui appartient à la famille des Ginkgoaceae pour l'étude phytochimiques qualitatives et quantitatives puis l'évaluation *in vitro* des activités biologiques (antioxydante, antidiabétique, antifongique et antibactérienne).

Sur le plan phytochimique, le criblage révèle une composition variée en métabolites secondaires, notamment la présence des flavonoïdes, de polyphénols et de tanins, ainsi que l'absence de saponosides.

L'analyse quantitative des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes a mis en évidence une teneur élevée en composés phénoliques estimée à $139,75 \pm 7,83 \mu\text{g EGA/mg}$ d'extrait, accompagnée d'une teneur plus modérée en flavonoïdes de $40,55 \pm 1,17 \mu\text{g QE/mg}$ d'extrait.

Dans le cadre de l'évaluation des activités biologique, les résultats obtenus montrent que :

- ❖ L'activité antioxydante de l'extrait EHAGB, évaluée à l'aide de trois tests (DPPH, FRAP et ABTS), révèle une activité antiradicalaire remarquables. Les propriétés antioxydantes mises en évidence *in vitro* pourraient résulter de la forte concentration en polyphénols de la plante.
- ❖ L'activité antidiabétique s'est révélée faible, l'extrait EHAGB présentant une capacité inhibitrice limitée de l'enzyme alpha-amylase.
- ❖ Une faible activité antifongique contre la souche (*fusarium oxysporum*)
- ❖ L'activité antibactérienne est testée vis-à-vis de deux souches antibactériennes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*), L'analyse montre une sensibilité faible contre la souche *E. coli* et modérée contre la souche *S. aureus*.

Perspectives

Au final, l'ensemble de ces résultats ouvre la voie à une étude détaillée de la composition chimique des différents extraits de *Ginkgo biloba* L., en utilisant diverses méthodes d'analyse avec différents solvants, ainsi qu'à la validation de nos résultats *in vitro* par des tests *in vivo*.

Références

Bibliographie

A

Addab, N., fetni, S., hamlaoui, F., zerguini, A., mahloul, K. (2020). Évaluation comparative de l'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques des feuilles d'*Olea europaea* L. de l'Est Algérien. *Journal de la Faculté de Médecine d'Oran (JFMO)*, 4(2(9à), 579. doi:10.5281/zenodo.4282436

Agostini-Costa, T., Vieira, R., Bizzo, H., Silveira, D., & Gimenes, M. (2012). Secondary Metabolites. Dans S. Dhanarsu (Éd.), *Chromatography and Its Applications* (p. 131). InTech.

Ahmed, M. A., Isah, U., Raubilu, I. A., Muhammad, S. I., & Ibrahim, D. (2019). An Overview of the enzyme : Amylase and Its Industrial Potentiel. *Bayero Journal of Pure and Applied Science*, 12(1), 352-358. doi:<http://dx.doi.org/10.4314/bajopas.v12i1.53S>

Aly ahmed , A.-E. (2011). Etude du mode d'action neurotoxique d'un repulsif, le deet utilise seul et en association avec un insecticide sur l'acetylcholinesterase des dum neurones d'un insecte la blatte *periplaneta americana*. [thèse de doctorat, Université d'Angers].

AMENI, D. (2015). Effets Antioxydants des Extraits de la plante médicinale *Daphne gnidium* L. utilisée en Algérie. [Mémoire de master, Université Ferhat Abbas Sétif 1]

Arenz, A. (1996). Occurrence of Neurotoxic 4'-O-Methylpyridoxine in *Ginkgo biloba* Leaves, *Ginkgo* Medications and Japanese *Ginkgo* Food. *Planta Medica*, 62, 548-551.

Aziz, , M., Diab, A., & Mohammed, A. (2019). Antioxidant Categories and Mode of Action. doi:<https://doi.org/10.5772/intechopen.83544>

B

Baker, M., Demoret, R., Ohtawa, M., & Shenvi, R. (2019). Concise Asymmetric Synthesis of (–)-Bilobalide. *Nature*, 575(7784), 643-646. doi: 10.1038/s41586-019-1690-5

Bauer, A., Kirby, M., Sherris, J., & al. (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *Am. J. Clin. Patho*, 45, 493–496.

BENAYAD, N. (2013). évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales marocaines.extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes marocaines et activité anticancéreuse. [Thède de doctorat, Université MOHAMMED V – AGDAL].

Benjamin, J., Muir, T., Briggs, K., & Pentland, B. (2001). "A case of cerebral haemorrhage—can *Ginkgo biloba* be implicated?". *Postgraduate Medical Journal (Postgrad Med J)*, 77, 112-113.

Bergamini, C., Gambetti, S., Dondi, A., & Cervellati, C. (2004). Oxygen, Reactive Oxygen Species and Tissue Damage. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14), 1611–1626.

Beyer, R. (1992). An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochemistry and cell Biology*, 70, 390-403.

Bikram Singh & al, P. K. (2008). Biology and chemistry of Ginkgo biloba. *Fitoterapia*, 79, 401-418. doi:10.1016/j.fitote.2008.05.007

Blois , M. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radicale. *Nature*, 4617(181), 1119-1200.

Bouattou, R. (2021-2022). Etude phytochimique , Nutritionnelle et activités biologiques de Ginkgo biloba L.(Les feuilles)[Mémoire de master, Université Blida1].

Boumadjen , r., & kimouche, s. (2018). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante de Romarin (Rosmarinus officinalis) [Mémoire de master,Université des Frères Mentouri].

BOUNIHI , A. (2016). Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de Melissa officinalis et de Mentha rotundifolia (Lamiacées) [Thèse de Doctorat National, Université Mohammed V, Rabat].

Brans, A. (2015). Les mycoses superficielles :Pharmacologie des anti-fongiques [Thèse de doctorat, Université Lille 2].

Byumanine Ntabaza, J. R., Kwebe Mayunga, D., & Flesi Nshobole, M. T. (2017). Screening phytochimique et évaluation de l'effet anti-diarrhéique des extraits aqueux et éthanoliques de Kalanchoe crenata (crassulaceae). *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 31(1), 31–40.

C

Cadet, E. (2017). Étude phytochimique et emplois de plantes veinotoniques. [Thèse de doctorat en pharmacie – Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie],HAL. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01932189v1>

Chan, P.-C., Xia, Q., & Fu, P. (2007). Ginkgo Biloba Leave Extract: Biological, Medicinal, and Toxicological Effects. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 25, 211-244. doi:10.1080/10590500701594714

Chollet, L. (2014). Identification des dermatophytes en culture sur la base de leurs critères microscopiques et microscopiques, 30.[Thèse de doctorat, Université de Lausanne].

Claudie, M. (2014). La place de la phytothérapie dans la prise en charge de l'insuffisance veineuse : étude de six plantes médicinales.[Thèse de doctorat,Université Joseph Fourier].

Colletier , J. P. (2006). Étude des relations structure - dynamique - fonction au sein de l'acétylcholinestérase [Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier (Grenoble I)].

Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 12, 564-582.

Crane , F. (2007). Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function. *Mitochondrion*, 7(2), 82-87. doi:10.1016/j.mito.2007.02.011

Crozier, A., Jaganath, I., & Clifford, M. (2006). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. Dans A. Crozier, M. Clifford, & H. Ashihara (Éds.), *Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* (pp. 1-24). Blackwell Publishing Ltd.

Cuvelier, C., Dotreppe, O., & Istasse, L. (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Med. Vét.*, 147, 315-324.

D

Da Silva , & al. (2009). Potential of Ginkgo biloba L. leaves in the management of hyperglycemia. *Bioresource Technology*, 100, 6599–6609. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.021>

De Cal, A., Pascua, S., Larena, I., & Melgarejo, P. (1995). Biological control of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. *Plant Pathology*, 44, 909-917.

Delacou, H., Dedome, E., Courcelle, S., Hary, B., & Ceppa , F. (2016). Déficit génétique en butyrylcholinestérase . *Annales de Biologie Clinique* , 74(3), 279-85 . doi:[10.1684/abc.2016.1141](https://doi.org/10.1684/abc.2016.1141)

Denys Durand et al. (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux / Oxidative stress in farm animals: General aspects. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 48, 218–224. doi:[[10.1016/j.cnd.2013.04.005](https://doi.org/10.1016/j.cnd.2013.04.005)]

Devec, E., & al. (2023). A Study on Phytochemical Composition, Antioxidant, and Anti-Cancer Activities of Ginkgo biloba L. *Commagene Journal of Biology*, 7(2), 99-106. doi:[10.31594/commagene.1322069](https://doi.org/10.31594/commagene.1322069)

Di Carlo , G., Mascolo, N., Izzo, A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: Old and New Aspects of a Class of Natural Therapeutic Drugs. *Life Sciences*, 65, 337-353.

Dorman, H. J., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.

E

EL-BELTAGI, H. S., & BADAWI, M. H. (2013). Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Properties for Ginkgo biloba and Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) from Egypt. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 126-135.

Ellman, G., Courtney, K., Andres, V, Featherston, R., & M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinestirse activity. *Biochem.Pharmacol*, 7, 88-95.

Elodie Cadet. (2017). Étude phytochimique et emplois de plantes veinotoniques. Thèse de doctorat en pharmacie [Thèse de doctorat, Université de Lorraine]. HAL. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01932189v1>

Emeraux, E. (2019). Propriétés biologiques des flavonoïdes : étude bibliographique et évaluation de l'activité antioxydante. [Thèse de doctorat,Université de Lorraine].

Eryılmaz Pehlivan, F. (2017). *Vitamin C: An Antioxidant Agent*. (IntechOpen, Éd.) doi: 10.5772/intechopen.69860

F

Fagot-Campagna, A., Romon, I., Fosse, S., & Roudier, C. (2010). Prévalence et incidence du diabète, et mortalité liée au diabète en France – Synthèse épidémiologique. *Institut de veille sanitaire*, 12.

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

FOURNIER , V. (2019). De la mémoire, en corps. La mémoire dans la maladie d'Alzheimer : les perspectives psychomotrices. *Université de Bordeaux, Collège Sciences de la Santé, Institut de Formation en Psychomotricité*, 90.

G

Gachowska, M., Szlasa, W., Saczko, J., & Kulbacka, J. (2021). Neuroregulatory role of ginkgolides. *Molecular Biology Reports*, 48, 5689-5697. doi:10.1007/s11033-021-06535-2

Garait, B. (2006). le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxygénation) et effet de la glisodin [Thèse de doctorat, Université Joseph-Fourier]. HAL.

Ghedira, K., Goetz, P., & Le Jeune, R. (2012). Ginkgo biloba (Ginkgoaceae) : ginkgo. *Phytothérapie*, 10, 194-201. doi:10.1007/s10298-012-0710-5

Guddadarangavvanahally , K., & al. (2008). Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3).

H

Hafidi , M.-H., & Tébaibia , B. (2024). Mémoire de Master Université 8 Mai 1945 Guelma. *Etude de l'effet de l'extrait de Ginkgo biloba sur l'inflammation colorectale induite par l'acide acétique et évaluation de son effet toxique et analgésique*.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J., Charlier , C., & Chapelle, J. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège (Rev Med Liège)*, 62(10), 628–638.

Hambate Gomdje, V. (2013). Élaboration et caractérisation des différentes électrodes modifiées par le Phosphate Naturel marocain et les Argiles camerounaises[Thèse de Doctorat, Université Sultan Moulay Slimane].

hasler, A. (2000). chemical constituents of ginkgo biloba.

Héritier, U. S., Mategeko, A. B., Nizigiyimana, L., & Tshimankinda , P. M. (2022). Criblage phytochimique, évaluation des activités antimicrobiennes et antiradicalaires des extraits de la partie aérienne de Leucas martinicensis (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) et de ses fractions. *Afrique SCIENCE*, 21(1), 181-193.

Huang, S., Duke, R., Chebib, M., Sasaki, K., Wada, K., & Johnston, G. (2003). Bilobalide, a sesquiterpene trilactone from *Ginkgo biloba*, is an antagonist at recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA receptors. *European Journal of Pharmacology*, 464, 1-8. doi:10.1016/S0014-2999(03)01344-X

Hülya Bayır, MD. (2005). Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 33(12), S498. doi:10.1097/01.CCM.0000186787.54500.12

I

Ibrahim, M., & Nuhu, A. (2016). Phytochemical Screening and Antibacterial/Antifungal Activities of *Ginkgo biloba* Extract EGb 761. *Pharmacy and Biological Sciences*, 11, 43-49.

Ighodaro, O., & Akinloye, O. (2018). First line defence antioxidants - superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence gr. *Alexandria Journal of Medicine*, 54, pp 287–293. doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001

Ingle, K. P., Deshmukh, A. G., Padole, D. A., Dudhbare, M. S., Maharil, M. P., & Khelurkar, V. C. (2017). Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6, 32-36.

Ipona, E. N., Kamalandua, B., Dani, T., Mayang, B., Ngbolua, K.-T.-N., Bolowei, D., . . . Kalulu, T. (2023). Screening phytochimique, activités anti-radicalaire et cytotoxique des extraits de quatre plantes utilisées dans la prise en charge de la dysfonction érectile à Mbandaka, République démocratique du Congo. *Journal of Applied Biosciences*, 185, 19504–19523. doi:<https://doi.org/10.35759/JABs.185.11>

J

Jara, A., Youssef, S., Uzal, E., Almagro, L., Navarro, S., & Pedreño, M. (2013). Biotechnological approaches to enhance the biosynthesis of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry Reviews*, 12, 191-205. doi:10.1007/s11101-013-9275-7

JARRAR, H. (2011). Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles. *Thèse de doctorat, École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier (ENSCM)*, 165.

JEAN R et al. (1994). Demonstration of the "Anti-Stress" Activity of an Extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761) Using a Discrimination Learning Task. *General Pharmacology*, 25, 1009-1016. doi:10.1016/0306-3623(94)90111-2

Joëlle Goudable, Alain Favier. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11, 115-120.

K

K. Ghedira et al., P. G. (2012). *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) : ginkgo. *Phytothérapie*, 10, 194-201. doi:10.1007/s10298-012-0710-5

k.Ghedira. (2005). structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4, 162-169. doi:10.1007/s10298-005-0096-8

Kastelan, P. L. (2000). Efficacy and safety of a Ginkgo biloba extract. *Public Health Nutrition*, 3(4A), : 495–499.

Katy Drieu, Hermann Jaggy. (2000). *History, Development and Constituents of EGb 761*. (G. a. Overseas Publishers Association N.V. (Harwood Academic Publishers, Éd.)

Kaur, N., Kumar, V., Nayak, S., Wadhwa, P., Kaur, P., & Sahu, S. (2021). Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus: A comprehensive review. *Chemical Biology & Drug Design*, 98, 1-22. doi:<https://doi.org/10.1111/cbdd.13909>

Kaur, P., & al. (2012). An Efficient Microwave Assisted Extraction of phenolic compounds and antioxidant Potentiel of Ginkgo biloba. *Natural product Communications*, 7(2), 203-206.

kherouf , m. (2021). Optimisation de la production d'amylases chez une souche d'actinomycète thermophile par plan d'expériences et étude biochimique avec application dans le domaine de la détergence [Thèse de doctorat Université Badji Mokhtar - Annaba].

Kleijnen, J., & Knipschild, P. (1992). Ginkgo biloba. *The Lancet*, 340, 1136.

Koczka, N., & al. (2016). Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Ginkgo Teas. *Acta Alimentaria*, 45(1), 77–84. doi:10.1556/066.2015.8888

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650. doi:10.1080/01926230290166724

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650. doi:10.1080/01926230290166724

kumar, A., Nirmal, P., Kumar, M., Jose, A., Tomer, V., OZ, E., . . . Oz, F. (2023). Major Phytochemicals: Recent Advances in Health Benefits and Extraction Method. *Molecules*, 28, 887. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules28020887>

Kurish A. Youdim et James A. Joseph. (2001). A Possible Emerging Role of Phytochemicals in Improving Age-Related Neurological Dysfunctions: A Multiplicity of Effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(6), 583-594.

L

Layoufi, c., & Manseur, d. (2021). Effet préventif de la vitamine c contre le stress. [Mémoire de master, Université Abdel Hafid Boussouf].

Lejus, C., Blanloeil, Y., Burnat, P., & Souron , R. (1998). Les cholinestérases. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 17, 1122-1135 .

Lin, H.-Y., Li, W.-H., Lin, C.-F., Wu, H.-R., & Zhao, Y.-P. (2021). International Biological Flora: Ginkgo biloba. *Journal of Ecology*. doi:10.1111/1365-2745.13856

Littarru, G., & Tiano, L. (2007). Bioenergetic and Antioxidant Properties of Coenzyme Q10: Recent Developments. *Molecular Biotechnology*, 37, 31-37. doi:10.1007/s12033-007-0052-y

Liu, X.-w., Yang, J.-l., Niu, W., Jia, W.-w., Olaleye, O., Qi Wen, X.-n., & Yu-hong Huang. (2018). Human pharmacokinetics of ginkgo terpene lactones and impact of carboxylation in blood on their platelet-activating factor antagonistic activity. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39, 1935-1946. doi: 10.1038/s41401-018-0086-7

López-Lluch , G. (2023). Coenzyme Q10. *Reference Module in Biomedical Sciences (Elsevier)*, 1-8. doi:10.1016/B978-0-12-818872-9.00087-7

Lubrano, V., & Balzan, S. (2015). Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World Journal of Experimental Medicine*, 5(4), 218–224. doi:10.5493/wjem.v5.i4.218

M

MA, T., Jia, L., Zhao, J., Lv, L., Yu, Y., Ruan, H., & Song, X. (2022). Ginkgolide C slows the progression of osteoarthritis by activating Nrf2/HO-1 and blocking the NF-κB pathway. *Frontiers in Pharmacology*. doi:10.3389/fphar.2022.1027553

Mahadevan , S., & Park, Y. (2008). Multifaceted Therapeutic Benefits of Ginkgo biloba L.: Chemistry, Efficacy, Safety, and Uses. *Journal of Food Science*, 73, R14-R19. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00597.x

Mahadevan , S., & Park, Y. (2008). Multifaceted Therapeutic Benefits of Ginkgo biloba L.: Chemistry, Efficacy, Safety, and Uses. *Journal of Food Science*, 73(1), R14. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00597.x

Malek , S. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 299, 125-124. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125124.

MARFAK, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur reactivite avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides [Thèse de doctorat, Université de Limoges].

Massion, P., Preiser, J.-C., & Balligand, J.-L. (2002). Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères ? / Reactive nitrogen species: deleterious or not? *Nutrition clinique et métabolisme*, 16, 248–252.

McKenna, D., Jones, K., & Hughes, K. (2001). Efficacy, Safety, and Use of Ginkgo BII in Clinical and Preclinical Applications. *Alternative Therapies*, 7(5), 70-86,88-90. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00597.x

More, M. P., Motule, A. S., Dongare, P. N., Patinge, P. A., Jawarkar, R. D., Bakal, R. L., & Manwar, J. V. (2021). Pharmacognosy, phytochemistry, pharmacology and clinical application of Ginkgo. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 16(02), 229–240.

Moussa, Z., Judeh, Z., & Ahmed, S. (2019). Non enzymatic exogenous and endogenous antioxidants. Dans IntechOpen (Ed.), *Free Radical Medicine and Biology* (pp. 1-22). doi:<https://doi.org/10.5772/intechopen.87778>

Mukherjee, P., Mal, M., & Houghton, P. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289–300. doi:10.1016/j.phymed.2007.02.002

Muller, L., Gnoyke , S., Popken , A., V.Bohm, v., v, b., & muller, l. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations.LWT. *Food science and technology*, 43, 992-999.

N

Nair, S., Kavreka, V., & Mishra, A. (2013). In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extract. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1), 128-132.

Natacha Brachet, & Brachet, N. (2023). Phytothérapie : principales indications et interactions médicamenteuses. 97. doi: dumas-03982132

Navarro, B. C., Aguilar, T. A., & Pérez, J. A. (2017). *Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress*. doi:<http://dx.doi.org/10.5772/65715>[1]

Nash , K., & Shah, Z. (2015). Current Perspectives on the Beneficial Role of Ginkgo biloba in Neurological and Cerebrovascular Disorders. *Integrative Medicine Insights*, 10, 1-9. doi:10.4137/IMI.S25054

NIANG, L., SEID ALI, M., AYESSOU, N., CISSE, M., & DIOP, C. (2021). Composition en métabolites secondaires et en minéraux de deux plantes médicinales : Bauhinia rufescens Lam et Sclerocarya birrea (A.Rich.) Hochst. *Afrique SCIENCE*, 19(2), 126 135.

NOUADRI , T. (2011). L’ α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation [Thèse de Doctorat, Université Frères Mentouri Costantine 1].

Ntabaza Byumanine, J. R., Kwebe Mayunga, D., & Flesi Nshobole, M. T. (2017). Screening phytochimique et évaluation de l’effet anti-diarrhéique des extraits aqueux et éthanoliques de *Kalanchoe crenata* (crassulaceae). *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 31(1), 31–40.

O

O. Sergent,et al. (2001). Alcool et stress oxydatif. *Pathologie Biologie*, 49, 689–695. doi:10.1016/S0369-8114(01)00244-9

O. Sticher. (1993). Quality of Ginkgo Preparations. *Planta Medica*, 59, 2-10.

Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 10-36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>

Otto sticher et al. (2000). *THE ANALYSIS OF GINKGO FLAVONOIDS*.

OUEDRAOGO, G. A. (1986). Contribution à la connaissance des valeurs sériques des enzymes du zébu Gobra (*PAL, TGP, TGO, GGT et LDH*)[Thèse de doctorat, Université de Dakar].

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

P

Patel, R. P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C. R., Jo, H., Freeman, B. A., & Darley-Usman, V. M. (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subject*, 1411, 385-400.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00028-6)

Pietta , T.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042. doi:10.1021/np9904509

Po-Chuen Chan. (2007). Ginkgo Biloba Leave Extract: Biological, Medicinal, and Toxicological Effects. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 25, 211-244. doi:10.1080/10590500701500414

Pourrut , B. (2008). Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, Vicia faba. [Thèse de doctorat, Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse].

PASTREI , J., & PRIVMENKO, N. (2007). Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Méd. Vit.*, 4, 106_109.
doi:<http://dx.doi.org/10.5772/65715>[1]

Perumal , S., & Klaus , B. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10–19. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.004>

Pierre Leroy . (2016). Les composants du stress oxydant et les radicaux libres . *Hegel* , 6(2), 218-219 . doi:[<https://doi.org/10.3917/hegel.062.0218>]

Pinar, O., & Rodriguez-Couto, S. (2024). Biologically active secondary metabolites from white-rot fungi. *Frontiers in Chemistry*.

Priyanka , A., Sindhu , G., Shyni , g., Preetha Rani , M., Nisha , V., & Raghu , G. (2017). Bilobalide abates inflammation, insulin resistance and secretion of angiogenic factors induced by hypoxia in 3T3-L1 adipocytes by controlling NF-κB and JNK activation. *International Immunopharmacology*, 42, 209-217. doi:10.1016/j.intimp.2016.11.019

U

Ulf T, B., & Terman, A. (2002). The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur. J. Biochem.*, 269, 1996-2002. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03026.x

R

Rizzo, A., Berselli, P., Zava, S., Gigliola, M., Negroni, M., Corsetto, P., & Berra, B. (2010). *Endogenous Antioxidants and Radical Scavengers*.

Rahman, k. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219–236. doi:<https://doi.org/10.2147/cia.S12159903>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala , A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorizationassay. *free Radical Bio.Med.*, 27, 1231-1237.

Reiter, R., Tan, D.-x., Mancheste, L. c., & Qi , W. (s.d.). Biochemical Reactivity of Melatonin with Reactive Oxygen and Nitrogen Species: A Review of the Evidence .

Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid Antioxidants. *Current Medicinal chemistry*, 8, 797-807. doi:<https://doi.org/10.2174/0929867013373011>

Robert M. Demoret et al. (2020). Synthetic, Mechanistic and Biological Interrogation of Ginkgo biloba Chemical Space en route to (–)-Bilobalide. *Journal of the American Chemical Society (J. Am. Chem. Soc.)*, 120(43), 18599–18618. doi:10.1021/jacs.0c08231

Rosni , I., Siti Norasikin , M. Z., Nagoor, N. H., Azlina , M., Hanum Gopala, A., Nizam Razak, K., . . . Siti Norasikin , O. (2012). α -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Sources. : *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(2), 161-183. doi: 10.18433/j3ps3r.

\$

S. Mahadevan et Y. Park. (2008). Multifaceted Therapeutic Benefits of Ginkgo biloba L.: Chemistry, Efficacy, Safety, and Uses. *Journal of Food Science*, 73(1), 14. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00597.x

Sati, S., & Joshi, S. (2011). Antibacterial Activities of Ginkgo Biloba L. Leaf Extracts. *TheScientificWorld*, 11, 2241-2246.

Sarkar, C., Quispe, C., Jamaddar, S., Hossain, R., Ray, P., Mondal, M., & Abdulwanis Mohamed, Z. (2020). Therapeutic promises of ginkgolide A: A literature-based review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 132, 110908. doi:10.1016/j.biopha.2020.110908

Singh, B., Kaur, P., Gopichand, Singh, R., & Ahuja, P. (2008). Biology and chemistry of Ginkgo biloba. *Fitoterapia*, 79, 401–418.

Smith, P. F., Maclennan , K., & Darlington , C. L. (1995). The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf:a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *Ethnopharmacology*, 50, 131-139.

Sticher, O., Meier, B., & Hasler, A. (2000). *The analyse of Ginkgo flavonoid*.

Stiefel, D. J., & Keller, P. J. (1973). Preparation and some properties of human pancreatic amylase including a comparison with human parotid amylase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 302, 345-361.

Strømgaard, K., & Nakanishi, K. (2004). Chemistry and Biology of Terpene Trilactones from Ginkgo Biloba. 43, 1640–1658. doi:10.1002/anie.200300601

Schuh, P., Thomae, D., & Gilbert , G. (1999). Synthèse de dérivés polycycliques hétéroatomiques à activité anticholinestérasique potentielle. *Arch. Sci. (Arch. Sci. Soc. Phys. Nat. Genève)*, 52(42), 39.

Sekli-Belaidi, F. (2011). Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly(3,4-éthylènedioxithiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin. [Thèse de doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier].

Sena ÖZTÜRK ,Aynur SARF. (2022). Therapeutic Application of Ginkgo biloba L. Tree: Systemic Review. *Journal of Literature Pharmacy Science*, 1, 21-34. doi:10.5336/pharmasci.2022-91528

Sharifi-Rad,, m., Anil Kumar, N., Zucca, P., Varoni, E., Dinis, L., Panzarini, E., & Rajkovic, J. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, 11, 694. doi:10.3389/fphys.2020.00694

Shi-hai, X., & Dian-chun, F. (2007). Pharmacological action and mechanisms of ginkgolide B. *Chinese Medical Journal (Chin Med J)*, 120, 922-928.

Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. *American. *Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Sundaram, A., & Krishna Murthy, T. (2014). α -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166–175. doi:10.12691/jaem-2-4-10

T

Tabassum, N.-E., Das, R., Lami, M., Chakraborty, A., Mitra, S., Tallei, T., . . . Dhama, K. (2022). Ginkgo biloba: A Treasure of Functional Phytochemicals with Multimedicinal Applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 30. doi:<https://doi.org/10.1155/2022/8288818>

Tamert, A., Latreche , A., & Aouad, L. (2017). Criblage phytochimique et activité antimicrobienne des extraits de Thymus serpyllum et de Thymus vulgaris du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*, 15, 384-394. doi:10.1007/s10298-017-1132-1

Tanaka , K., Kester, K., Berova, N., & Nakanishi, K. (2005). Preparation of ginkgolide and F- seco-ginkgolide lactols: the unique reactivity of α -hydroxy lactones toward NaBH₄. *Tetrahedron Letters*, 46, 531-534. doi:10.1016/j.tetlet.2004.10.113

Teris A. van Beek. (2009). Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2002-2032. doi:10.1016/j.chroma.2009.01.013

Therond, P. (2006). Stress oxydant. Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Ann Pharm Fr*, 383-389. doi:10.1016/S0003-4509(06)75333-0

Tvrdá, E., & Benko, F. (2020). *Free radicals: what they are and what they do*. (V. Preedy, Éd.) Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815972-9.00001-9>

Topçu, G., Ay, A., Bilici , A., Sarikurkcu, c., Ozturk, M., & Ulubelen , A. (2007). A new flavone from antioxidant extract of pistacia terebinthus. *Food chemistry*, 103, 816-822.

Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central*, 1, 1-4. doi:doi:10.1186/1752-153X-1-13

V

Vale, S. (1998). Subarachnoid haemorrhage associated with Ginkgo biloba. *The Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(05)79516-7

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001

van Beek, T., & Montoro, P. (2009). Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts,. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2002-2032. doi:10.1016/j.chroma.2009.01.013.

Vona, R., Pallotta, L., Cappelletti, M., Severi, C., & Matarrese, P. (2021). The Impact of Oxidative Stress in Human Pathology: Focus on Gastrointestinal Disorders. *Antioxidants*, 10, 1-26.

W

Waring , W. S. (2002). Urate and Important Antioxidant in Acute Ischaemic Stroke . *QJM*.

White, H., Scates, P., & Cooper, B. (1996). Extracts of Ginkgo Biloba Leaves Inhibit Monoamine Oxidase. *Life Sciences*, 58, 1315-1321. doi:10.1016/0024-3205(96)000975

X

Xin Yao et al. (2012). Comparative Characterization of Total Flavonol Glycosides and Terpene Lactones at Different Ages, from Different Cultivation Sources and Genders of Ginkgo biloba Leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 10305-10315. doi:10.3390/ijms130810305

Y

Yang, X.-W., Huang, M.-Z., Jin , Y.-S., Sun, L.-N., Song, Y., & Chen, H.-S. (2012). Phenolics from Bidens bipinnata and their amylase inhibitory properties. *Fitoterapia*, 83, 1169-1175. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2012.07.005>

Yi , S. (1990). ,Antioxidant Enzymes, and Carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 583–599. doi:[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90156-D](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90156-D)

Yun-Peng Zhao et al. (2019). Resequencing 545 ginkgo genomes across the world reveals the evolutionary history of the living fossil. *Nature Communications*, 10-4201. doi: 10.1038/s41467-019-12133-5

Z

Zelenka, J., Dvořák, A., Alán, L., Zadinová, M., Haluzík, M., & Vitek, L. (2016). Hyperbilirubinemia Protects against Aging-Associated Inflammation and Metabolic Deterioration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi:10.1155/2016/6190609.

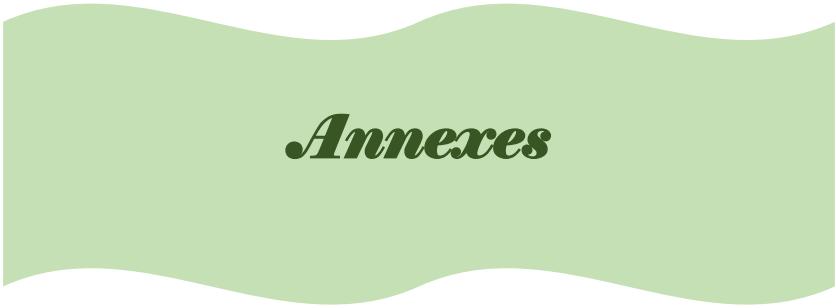
Zengin , & al. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*, 53, 244-251.

Zhu Tao et al. (2019). Evaluation of the anti-inflammatory properties of the active constituents of *Ginkgo biloba* for the treatment of pulmonary diseases. *Food & Function*, 175. doi: 10.1039/C8FO02506A

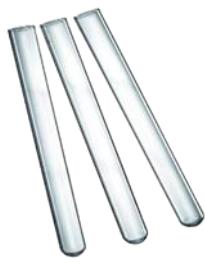
Zuo, W., Yan, F., Zhang, B., Li, J., & Mei, D. (2017). Advances in the Studies of *Ginkgo Biloba* Leaves Extract on Aging-Related Diseases. *Aging and Disease*, 8(6), 812-826.

Sites web :

- i. <https://images.app.goo.gl/42jNZN8xy9PHGcYM8>
- ii. <https://images.app.goo.gl/iMWbN53Jx7ZLrBQt5>
- iii. <https://images.app.goo.gl/hJUFeNggDA74p9ZEA>
- iv. <https://images.app.goo.gl/WMeFvB8zvLffUgPr8>
- v. <https://images.app.goo.gl/vpv6CtLQJH3LJCdFA>
- vi. <https://images.app.goo.gl/oJ9Tke7zz3izvsPg6>



Annexes



Tubes à essai



Micropipette



Tube Eppendorf



Microplaque



**Spectrophotomètre
des plaques**



Agitateur magnétique



Balance de précision



Eprouvette



Erlenmeyer



Bécher



Portoir



Spatule



Papier filtre



Boîte de pétri



Etuve



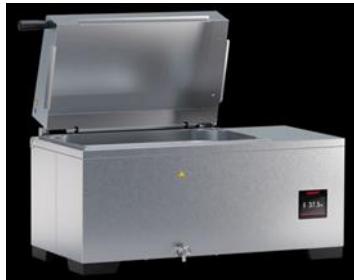
Vortex



Evaporateur rotatif



Barreaux magnétiques



Bain Marie



Réfrigérateur



Mortier



Entonnoir

Résumé

Le *Ginkgo biloba* L., est une plante médicinale appartenant au genre *Ginkgo* et à la famille *Ginkgoaceae*.

Notre mémoire a pour objectif de réaliser une étude chimique quantitative et qualitative des métabolites secondaires, ainsi que l'évaluation de certaines activités biologiques d'un extrait hydro-méthanolique de poudre de feuilles de *Ginkgo biloba*.

Les analyses chimiques de la poudre de feuilles de *Ginkgo biloba* ont révélé la présence de composés phénoliques, flavonoïdes et de tanins, et l'absence de saponines. La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, avec une moyenne de $(139,75 \pm 7,83\mu\text{g GA}/\text{mg})$, tandis que la teneur totale en flavonoïdes a été évalué à $(40,55 \pm 1,17\mu\text{g QE}/\text{mg})$ selon la méthode au chlorure d'aluminium.

En ce qui concerne l'activité antioxydante, elle a été évaluée selon trois méthodes (DPPH, ABTS, FRAP), et les résultats ont montré une activité notable de l'extrait de *Ginkgo biloba*. En outre, les résultats de l'évaluation de l'activité antidiabétique montrent que l'extrait hydro-méthanolique a une faible capacité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase avec une valeur de $\text{IC}_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$.

Quant à l'évaluation de l'activité antifongique a montré que l'extrait de *Ginkgo biloba* était faible contre la souche fongique FOL, tandis que le teste antibactérien a montré une activité notable contre la souche *S. aureus* avec des diamètres de zone d'inhibition allant de 7 à 9 mm à différentes concentrations, contrairement à l'activité contre *E. coli*, qui était faible.

Mots clés : *Ginkgo biloba* L., extrait hydro-méthanolique, screening phytochimique polyphénols totaux et flavonoïdes, Antioxydante, Antidiabétique, Antifongique et Antibactérienne.

Abstract

Ginkgo biloba L., is a medicinal plant belonging to the genus Ginkgo and the family Ginkgoaceae.

Our study aims to conduct a quantitative and qualitative chemical analysis of secondary metabolites, in addition to evaluating some of the biological activities of a water-methanol extract from *Ginkgo biloba* leaf powder.

Chemical analyses of *Ginkgo biloba* leaf powder revealed the presence pf phenolic compounds, flavonoids, and tannins, and the absence of saponins. The total content of phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, with an average of $(139,75 \pm 7,83\mu\text{g EGA/mg})$, while the total content of flavonoids was evaluated at $(40,55 \pm 1,17\mu\text{g QE/mg})$ according to the aluminum chloride method.

As for antioxidant activity, it was evaluated using three methods (DPPH, ABTS, FRAP), and the results showed remarkable activity for *Ginkgo biloba* extract. In addition, the results of the evaluation antidiabetic activity showed that the methanol aqueous extract had a weak ability to inhibit the alpha-amylase enzyme with an IC₅₀ value $>400\ \mu\text{g/ml}$.

The evaluation of antifungal activity revealed that the extract *Ginkgo biloba* was weak against the FOL fungal strain, while the antibacterial test showed remarkable activity against the *S. aureus* strain with inhibition zone diameters ranging from 7 to 9 mm at different concentrations, unlike the activity against *E. coli*, which was weak.

Keywords: *Ginkgo biloba* L., hydro-methanolic extract, phytochemical screening, total polyphenols and flavonoids, Antioxidant, Antidiabetic, Antifungal, and Antibacterial.

الجنة بيلوبا هي نبات طبي ينتمي إلى جنس الجنة وعائلة Ginkgoaceae.

تهدف أطروحتنا إلى إجراء دراسة كيميائية كمية ونوعية للمستقلبات الثانوية، بالإضافة إلى تقييم بعض الأنشطة البيولوجية لمستخلص مائي-ميثانولي من مسحوق أوراق الجنة بيلوبا.

كشفت التحليلات الكيميائية لمسحوق أوراق الجنة بيلوبا عن وجود مركبات فينولية وفلافونويدات ونانينات، وغياب الصابونين. تم تحديد المحتوى الكلي للمركبات الفينولية باستخدام مفاعل Folin-Ciocalteu، بمتوسط $7,83 \pm 139,75$ ميكروغرام من مكافئ حمض الجاليك/مغ، بينما تم تقييم المحتوى الإجمالي للفلافونويدات بـ $(40,55 \pm 17,1)$ ميكروغرام من مكافئ الكيرسيتين/مغ) وفقاً لطريقة كلوريد الألمنيوم.

أما بالنسبة للنشاط المضاد للأكسدة، فقد تم تقييمه باستخدام ثلاثة طرق (DPPH, ABTS, FRAP) وأظهرت النتائج نشاطاً ملحوظاً لمستخلص الجنة بيلوبا. بالإضافة إلى ذلك أظهرت نتائج تقييم النشاط المضاد لمرض السكري أن المستخلص المائي الميثانولي له قدرة ضعيفة على تثبيط إنزيم ألفا أميلاز بقيمة $IC50 > 400$ ميكروغرام/مل.

كشف تقييم النشاط المضاد للفطريات أن مستخلص الجنة بيلوبا كان ضعيفاً ضد سلالة الفطريات FOL، في حين أظهر الإختبار المضاد للبكتيريا نشاطاً ملحوظاً ضد سلالة *S. aureus* بأقطار منطقة تثبيط تتراوح من 7 إلى 9 مم بتراتيز مختلف، على عكس النشاط ضد *E. Coli* الذي كان ضعيفاً.

الكلمات المفتاحية: الجنة بيلوبا، مستخلص مائي-ميثانولي، فحص كيميائي نباتي، البوليفينول الكلي الفلافونويد، مضاد للأكسدة، مضاد للسكري، مضادة للفطريات ومضادة للبكتيريا.

Année universitaire : 2024-2025	Présenté par : AYADI Ikram ADOUI Ikram
Etude phytochimique et évaluation <i>in vitro</i> des activités antioxydante, antidiabétique, antifongique et antibactérienne d'extrait de la plante <i>Ginkgo biloba</i> L.	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée	
Résumé	
<p><i>Le Ginkgo biloba</i> L. est une plante médicinale appartenant au genre <i>Ginkgo</i> et à la famille <i>Ginkgoaceae</i>.</p>	
<p>Notre mémoire vise à réaliser une étude chimique quantitative et qualitative des métabolites secondaires, ainsi qu'à évaluer certaines activités biologiques d'un extrait hydro-méthanolique de poudre de feuilles de <i>Ginkgo biloba</i>.</p>	
<p>Les analyses chimiques de la poudre de feuilles de <i>Ginkgo biloba</i> ont révélé la présence de composés phénoliques, flavonoïdes et de tanins, et l'absence de saponines. La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, avec une moyenne de $(139,75 \pm 7,83\mu\text{g EGA/mg})$, tandis que la teneur totale en flavonoïdes a été évalué à $(40,55 \pm 1,17\mu\text{g QE/mg})$ selon la méthode au chlorure d'aluminium.</p>	
<p>Quant à l'activité antioxydante, elle a été évaluée selon trois méthodes (DPPH, ABTS, FRAP), et les résultats ont montré une activité notable de l'extrait de <i>Ginkgo biloba</i>. En outre, les résultats de l'évaluation de l'activité antidiabétique montrent que l'extrait hydro-méthanolique a une faible capacité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase avec une valeur de $\text{IC50} > 400 \mu\text{g/ml}$.</p>	
<p>L'évaluation de l'activité antifongique a également révélée que l'extrait de <i>Ginkgo biloba</i> était faible contre la souche fongique FOL, tandis que le teste antibactérienne a montré une activité notable contre la souche <i>S. aureus</i> avec des diamètres de zone d'inhibition allant de 7 à 9 mm à différentes concentrations, contrairement à l'activité contre <i>E. coli</i>, qui était faible.</p>	
<p>Mots-clefs : <i>Ginkgo biloba</i> L., extrait hydro-méthanolique, screening phytochimique polyphénols Totaux et flavonoïdes, Antioxydante, Antidiabétique, Antifongique et Antibactérienne.</p>	
<p>Laboratoires de recherche : laboratoire de Biochimie (U Constantine 1 Frères Mentouri), laboratoire de contrôle de qualité, laboratoire de mycologie et laboratoire de bactériologie (Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine)</p>	
<p>Président du jury : Dr KHEDARA A. (MC(A)– U Constantine1 Frères Mentouri).</p>	
<p>Encadrant : Dr LAID EP BOUANIMBA N. (MC(A)- UFM Constantine 1).</p>	
<p>Examinateur(s) : Dr BOUDERSA N. (MC(B) - UFM Constantine 1).</p>	