

Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen-

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers

Département de Biologie

Laboratoire

2013 أكتوبر 03

MÉMOIRE DE MASTER

EN

BIOCHIMIE APPLIQUÉE

THÈME:



Inscrit sous le N°:
Date le: 7/4/28
Co: 2013 أكتوبر 03

**Contribution à l'étude phytochimique et effet
hémolytique de trois plantes antidiabétiques :
*Citrullus colocynthis, Nerium oleander, et
Ammiodes verticillata***

Présenté par : M^{me} BOUREK Zohra

Soutenue le: 29/09/2013

Devant le jury composé de:

- | | | |
|---------------------------------|-----------------------|--------------|
| • M ^{elle} BENARIBA N. | Maitre assistante | Présidente. |
| • M ^{elle} BELKACEM N. | Maitre assistante | Examinatrice |
| • M ^r AZZI R. | Maitre de conférences | Promoteur |

Année universitaire 2012-2013

DÉDICACE

Je dédie ce travail à:

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

*Mon cher époux **Ali** et à sa famille*

Je ne saurais trouver les mots pour t'exprimer mes sentiments. Alors je te dirai tout simplement merci pour tes encouragements, ta confiance, ta patience et surtout ta compréhension m'ont été indispensables pour la réalisation de ce mémoire. Sois assuré de ma fidélité infini.

*A mon fils **Abdel-Hay**, ton joie, ton gaieté et ton insouciance me comble de bonheur. Puisse Dieu te garde et éclaire ta route.*

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

*Mes deux chères sœurs (**Leila** et **Ilham**) je vous souhaite une longue vie et bonne santé.*

*Mes oncles, tantes, cousins et cousines, et à toute la famille **Bourek** et **Ben-Ahmed***

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant, Le miséricordieux, pour m'avoir donnée la force, la patience et le pouvoir de raisonner.

*Mes profonds remerciements s'adressent en premier lieu à mon encadreur **Mr Azzi Rachid**, maître de conférences à département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son aide, ses encouragements, ses précieux conseils, sa confiance, sa patience, ... tout au long de la réalisation de ce mémoire. Pour tout cela je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.*

*Avec tout mon respect je tiens à remercier **M^{elle} Benariba N**, maître assistante à département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen-, d'avoir accepté de présider le jury.*

*Mes sincères remerciements vont à **M^{elle} Belkacem N**, maître assistante à département de biologie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen-, d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*je remercie également **M^{me} BOUCHRIT. Z** maître de conférences au département de biologie, Université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen – et directrice de Laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » ou nous avons le plaisir d'effectuer ce travail*

Je tiens à remercier également tous qui ont participé à la réalisation de ce modeste travail de près ou de loin et surtout aux membres du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, Physicochimiques, Synthèse et activité biologique.

Résumé

Ce travail porte sur l'étude des tests phytochimiques et l'étude d'effet hémolytique d'extraits de trois plantes utilisées traditionnellement par la population de l'Ouest algérien pour du traitement du diabète sucré. Ces plantes sont les graines de *Citrillus colocynthis*, les feuilles de *Nerium oleander* et la partie aérienne d'*Ammiodes verticillata*.

L'analyse phytochimique a révélé la présence des tanins, glycosides, saponines et surtout les alcaloïdes dans l'extrait de *Citrillus colocynthis*. L'extrait de *Nerium oleander* a montré la présence des tanins, glycosides, saponines, flavonoïdes et surtout les anthraquinones libres. Tandis que l'extrait d'*Ammiodes verticillata* contient des tanins, glycosides, saponines, flavonoïdes et surtout les composés réducteurs.

La recherche d'effet hémolytique a été effectuée pour différentes concentration des trois plantes dans une suspension érythrocytaire préparée à partir du sang humain incubé à 37°C dans un milieu tampon PBS à pH 7,4.

Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait d'*Ammiodes verticillata* présente un effet hémolytique très moindre par rapport aux extraits de *Citrullus colocynthis* et *Nerium oleander* avec un taux d'hémolyse comparé à l'hémolyse total égale à 2,98% ; 9,84% et 26,61% d'*Ammiodes verticillata*, *Nerium oleander* et *Citrullus colocynthis* respectivement.

Mots clés : tests phytochimiques, diabète sucré, *Citrullus colocynthis*, *Nerium oleander*, *Ammiodes verticillata*, effet hémolytique.

Sommaire

| | |
|-----------------------------|-----|
| Sommaire | I |
| Liste des figures | IV |
| Liste des tableaux | V |
| Liste d'abréviation | VI |
| Introduction générale | VII |

Synthèse bibliographique

1-Généralités sur le diabète sucré

| | |
|-----------------------------------|---|
| 1. Définition..... | 3 |
| 2. Épidémiologie..... | 3 |
| 2.1. Dans le monde..... | 3 |
| 2.2. Dans l'Algérie..... | 3 |
| 3. Classification..... | 3 |
| 3.1. le diabète de type1 | 4 |
| 3.2. le diabète de type2..... | 4 |
| 3.3. le diabète gestationnel..... | 4 |
| 3.4. le diabète secondaire..... | 4 |
| 4. Complications..... | 5 |
| 5. Traitements..... | 6 |

2-Plantes antidiabétiques

| | |
|---|----|
| 1. Introduction..... | 8 |
| 2. Plantes antidiabétiques..... | 9 |
| 3. Etude de la toxicité..... | 9 |
| 4. La recherche de la toxicité des plantes..... | 11 |
| 5. L'hémolyse..... | 12 |

3- plantes étudiés

| | |
|---------------------------------------|----|
| 1. <i>Citrullus colocynthis</i> | 14 |
| 1.1. Présentation de la plante..... | 14 |
| 1.2. Description botanique..... | 15 |
| 1.3. Usage tradutionel..... | 16 |
| 1.4. Toxicité..... | 16 |
| 1.5. Composition chimique..... | 17 |
| 2. <i>Nerium oleander</i> | 19 |
| 2.1. Présentation de la plante..... | 19 |
| 2.2. Description botanique..... | 20 |
| 2.3. Usage tradutionel..... | 21 |
| 2.4. Toxicité..... | 22 |
| 2.5. Composition chimique..... | 22 |
| 3. <i>Ammoides verticillata</i> | 24 |
| 3.1. Présentation de la plante..... | 24 |
| 3.2. Description botanique..... | 25 |
| 3.3. Usage tradutionel..... | 25 |
| 3.4. Composition chimique..... | 26 |

Matériels et Méthodes

1- Analyses phytochimiques

| | |
|---|----|
| 1. Matériel végétal..... | 27 |
| 1.1. La coloquinte (<i>citrullus colocynthis</i>) | 27 |
| 1.2. Laurier rose (<i>nerium oleander</i>)..... | 27 |
| 1.3. <i>Ammoides verticillata</i> | 27 |
| 2. Screening phytochimiques..... | 27 |
| 2.1. Préparation des extraits..... | 28 |
| 2.2. Tests phytochimiques..... | 29 |

2-Analyses biologiques

| | |
|---|----|
| Evolution de l'effet hémolytique..... | 31 |
| 1. Préparation du PBS..... | 31 |
| 2. Préparation de la suspension sanguine..... | 31 |
| 3. Préparation d'extrait..... | 31 |
| 4. L'effet hémolytique..... | 31 |

Résultats et interprétations

| | |
|---------------------------------------|----|
| Screening phytochimiques..... | 33 |
| 1. <i>Citrullus colocynthis</i> | 33 |
| 2. <i>Nerium oleander</i> | 34 |
| 3. <i>Ammoides verticillata</i> | 35 |
| Effet hémolytique..... | 36 |
| Discussion..... | 42 |
| Conclusion général..... | 46 |

Listes des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Coloquinte <i>Citrullus Colocynthis</i> | 14 |
| Figure 2 : <i>Nerium oleander</i> partie aérienne (feuilles et fleurs)..... | 19 |
| Figure 3 : <i>Ammoides verticullata</i> (partie aérienne)..... | 24 |
| Figure 4 : L'évolution de l'absorbance des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait des graines de <i>Citrullus colocynthis</i> incubée à 37°C durant 45 min à 548 nm..... | 36 |
| Figure 5 : L'évolution de l'absorbance des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait des feuilles de <i>Nerium oleander</i> incubée à 37°C durant 45 min à 548 nm..... | 37 |
| Figure 6 : L'évolution de l'absorbance des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait de la partie aérienne d' <i>Ammiodes verticillata</i> . Incubée à 37°C durant 45 min à 548 nm..... | 37 |
| Figure 7 : Evolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations de <i>Citrullus colocynthis</i> après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total..... | 39 |
| Figure 8 : Evolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations de <i>Neriumoleander</i> après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total..... | 39 |
| Figure 9 : Evolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations d' <i>Ammiodes verticillata</i> après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total..... | 40 |
| Figure 10 : Evolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations des trois plantes étudiées après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total..... | 41 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Composition en métabolites secondaires des différentes parties de la coloquinte (<i>Citrullus colocynthis</i>). | 18 |
| Tableau 2 : Principales utilisations de <i>Nerium oleander</i> en médecine traditionnelle selon les pays..... | 21 |
| Tableau 3 : Constituants chimiques des différentes parties de <i>Nerium oleander</i> | 22 |
| Tableau 4 : l'étude phytochimique d' <i>Ammoides verticillata</i> | 26 |
| Tableau 5 : Tests phytochimiques des extraits aqueux et chloroformique des graines de <i>Citrullus colocynthis</i> préparés par décoction, infusion et macération..... | 33 |
| Tableau 6 : Tests phytochimiques des extraits aqueux et chloroformique des feuilles de <i>Nerium oleander</i> préparés par décoction, infusion et macération..... | 34 |
| Tableau 7 : Tests phytochimiques des extraits aqueux et chloroformique de la partie aérienne d' <i>Ammoides verticillata</i> préparés par décoction, infusion et macération..... | 35 |

Liste d'abréviations

ADA : American Diabète Association.

DL₁₀₀ : Dose Létale 100.

DL₅₀ : Dose Létale 50.

FID : Fédération Internationale du Diabète

OMS : Organisation mondiale de la santé

PPAR γ : Peroxysome proliferator activated receptor

S.F.E: Société Française d'Ethnopharmacologie

Introduction générale

Introduction générale :

Le diabète est un fléau mondial, c'est une maladie métabolique grave, complexe qui frappe une fraction importante de la population. Il est l'une des principales maladies non transmissibles dont la fréquence augmente à une vitesse alarmante partout dans le monde, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Le nombre total de cas de diabète, estimé en 2011 est 356 millions. Dans la majorité des cas, au moins 90%, il s'agit d'un diabète de type 2, il se manifeste sous forme de véritable « épidémie silencieuse ». Il a de graves conséquences en termes de morbidité, de mortalité et de prise en charge médicale très coûteuse [OMS, 2011].

L'approche thérapeutique est d'une grande importance dans ce domaine. Elle permet de recenser les remèdes antidiabétiques et de constituer une base de données de plantes médicinales afin de conserver un savoir ancestral qui s'appuie essentiellement sur une tradition orale.

L'Organisation mondiale de la santé a entrepris depuis mai 1978 l'étude des plantes médicinales, qui a conduit à l'identification, dans un premier temps, de 20000 plantes médicinales, et dans le second temps la recherche plus détaillée sur une liste de à 200 plantes ; et leur emploi actuel se fonde essentiellement sur la médecine traditionnelle [Myers, 1981].

D'après Marles et Farnsworth, 1996, 80% de la population mondiale utilise les plantes médicinales pour se soigner et traiter les maladies (diabète, cancer, la grippe, hypertension,...), dont plus de 1123 espèces de plantes, recensées par les ethnopharmacologues, sont expérimentées contre le diabète de type2 [Marles et Farnsworth, 1996].

Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la pharmacie des médicaments très efficaces. Cette découverte de nouveaux médicaments s'est effectuée en recherchant les principes actifs de plantes médicinales qui pour la plupart, étaient des plantes toxique [Baghdikian et al, 1997].

L'obtention d'un contrôle glycémique satisfaisant dans le but de prévenir les complications liées au diabète nécessite le recours à des agents pharmacologiques en plus du traitement hygiéno-diététique [Virally et al, 2007].

En Algérie, des plantes médicinales sont recensés après une enquête ethnopharmacologiques réalisée auprès des diabétiques de la région Ouest [Azzi, 2012].

Les plantes médicinales malgré leurs effets thérapeutiques doivent être utilisées avec la plus grande prudence car elles peuvent avoir un risque de toxicité [fouché et al, 2000].

Notre but est l'évaluation d'effets hémolytiques des plantes traditionnelles antidiabétiques utilisées dans la région Ouest Algérien, qui son : *Citrullus colocynthis*, *Ammiodes verticillata* et *Nerium oleander*.

Ce travail comporte deux parties, une synthèse bibliographique ; dans laquelle le diabète sucré, leur classification, complications, et leur traitement par les plantes médicinales et leur toxicité, et une étude expérimentale dans laquelle nous avons réalisé les expériences suivantes :

- ✓ Préparation l'extrait des plantes utilisées.
- ✓ Réaliser un screening phytochimique des différents extraits.
- ✓ Evaluer l'effet hémolytique des plantes étudiées.

Première partie :
Synthèse bibliographie

Généralité sur le diabète sucré

1-Définition de diabète sucré :

Le diabète sucré est une affection métabolique, touchant le métabolisme glucidique lipidique et protéique, caractérisée par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline). [Kuzuya et al ; 2002].

2-Epidémiologie du diabète :

2-1-Dans le monde :

Le diabète est une maladie courante dont la fréquence augmente à une vitesse alarmante partout dans le monde. En 1985, le nombre de diabétiques dans le monde était estimé à 30 millions. En 1995, il était monté à 135 millions. En 2000, on recensait 171 millions de diabétiques dans le monde. Ce nombre a été estimé à 194 millions en 2004 [Simon et al, 2005 ; OMS et FID, 2004].

En 2011, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a enregistré 356 millions de diabétiques dans le monde en 2011 [OMS, 2011].

2-2 Dans l'Algérie :

En 2010, la fédération internationale du diabète (FID) a enregistré un million 632 mille diabétiques en Algérie. Ce chiffre peut atteindre jusqu'à 2 millions 850 mille en 2030, avec une augmentation de 61 mille nouveaux cas recensés par an [Whiting, 2011].

3-Classification du diabète :

Plusieurs mécanismes physiopathologiques distincts peuvent aboutir au syndrome biologique commun à tous les types de diabète sucré : l'hyperglycémie. Ce sont ces entités physiopathologiques qui permettent de définir le type de diabète. Il existe quatre formes de diabètes : [ADA, 1997]

- Le diabète de type 1
- Le diabète de type 2
- Le diabète gestationnel
- Le diabète secondaire

3-1-le diabète de type1 :

Le diabète de type1, ou encore diabète maigre, représente 10% environ de tous les cas de diabète. Est une maladie auto-immune détruisant les cellules β du pancréas, caractérisée par la disparition totale ou presque totale de la sécrétion d'insuline par le pancréas endocrine. Cette carence insulinique est responsable d'une augmentation inéluctable de la glycémie et d'une évolution fatale en l'absence de traitement. Le traitement par l'insuline permet une vie pratiquement normale [Permuter et Morin, 2002].

3-2-le diabète de type2 :

Le diabète de type 2est beaucoup plus fréquent et représente environ 90% de tous les cas de diabète, cette forme se rencontre principalement chez l'adulte (OMS, 2002). Il est associé à une obésité dans 80% des cas, il est le plus souvent polygénique résultant de l'association d'une prédisposition génétique et de facteurs environnementaux en particulier le surpoids.

Le diabète de type 2est caractérisé par une altération de l'insulinosécrétion et/ou des anomalies des effets de l'insuline sur ses tissus cibles (insulinosensibilité) [Halimi et al, 1999].

3-3- Le diabète gestationnel :

Le diabète gestationnel est généralement transitoire et disparaît dans les semaines suivant l'accouchement. Les femmes qui ont souffert du diabète gestationnel risquent d'avantage de développer un diabète type 2 par la suite [Naylor et al, 1997].

3- 4- Le diabète secondaire :

Les autres types de diabète (diabètes secondaires) sont définis génétiquement,ou associés à d'autres maladies, ou à des médicaments

Selon l'ADA [ADA, 1997 ; OMS, 1999], diabète secondaires est liés à :

- Une maladie du pancréas.
- Une maladie endocrinienne.
- Des médicaments ou composés toxiques.
- Une anomalie d'origine génétique de l'action de l'insuline.
- D'autres maladies génétiques (parfois) associées au diabète.

- Un dysfonctionnement d'origine génétique des cellules β .

4-Les complications liées au diabète :

Les complications du diabète sont importantes et sont de deux types : des complications aiguës qui sont très répandues chez le diabète de type 1 et d'autres chroniques qui se trouvent surtout chez le diabète de type 2 [Capet et al, 1999].

4-1-Les complications métaboliques aiguës :

Sont présentées par des accidents hypoglycémiques et trois complications hyperglycémiques du diabète : acidocétose diabétique, syndrome d'hyperglycémie hyperosmolaire (anciennement coma hyperosmolaire) et acidose lactique [Orban et Ichai, 2008].

4-2-Les complications chroniques :

Elles ne sont pas fatales mais secondaire à l'hyperglycémie chronique durant des années (5 à 15 ans). On distingue les complications liées à la micro-angiopathie (rétinopathie, néphropathie, neuropathie) et celles liées à la macro-angiopathie (cardiovasculaires) [Duron et Heurtier, 2006].

4-2-1-Les complications microangiopathiques :

Elles sont cliniquement responsables de l'atteinte des capillaires rétinien et glomérulaire rénaux et aussi nerveux.

Les complications microangiopathiques sont la conséquence d'une toxicité directe du glucose, avec amplification des voies métaboliques intracellulaire [Wolffenbittel et Van Haeften, 1995].

4-2-2-Les complications macroangiopathiques :

La constitution de la macroangiopathie diabétique ferait intervenir l'hypertension artérielle, des anomalies lipidiques complexes, la toxicité vasculaire du glucose, et éventuellement l'insulino-résistance [Wolffenbittel et Van Haeften, 1995].

Par opposition à la microangiopathie qui touche la microcirculation, on désigne sous le terme de macroangiopathie, diabétique, l'atteinte des artères musculaires allant de l'aorte jusqu'aux petites artères distales d'un diamètre supérieur à 200 μm [Grimaldi, 1999].

Les complications cardiovasculaires représentent la cause majeure de la mortalité chez les diabétiques de type 1 et de type 2 [Grimaldi et Timist, 1996].

5-Traitement du diabète sucré :

5-1-Les traitements non médicamenteux :

Des mesures hygiéno-diététiques doivent être mises en œuvre, une alimentation équilibrée est conseillée, avec une augmentation des apports en glucides lents et une diminution des apports en graisses saturées, des sucres rapides et de l'alcool [ANAES, 2000].

Une activité physique adaptée aux possibilités de chaque patient est recommandée chez le diabétique de type 2 car elle contribue à une amélioration de la situation métabolique (insulinosensibilité, niveau glycémique, pression artérielle, profil lipidique, etc.) et pourrait être utile pour le contrôle du poids [ANAES, 2000].

5-2-Traitement du diabète de type 1 :

Le diabète de type 1 est caractérisé par une perte de la fonction pancréatique avec une insulino-pénie absolue. Devant cette condition les objectifs thérapeutiques consistent à apporter l'insuline endogène qui fait défaut [Gin et Rigalleau, 1999].

5-3-Traitement du diabète de type 2 :

Le traitement de cette affection nécessite d'utiliser des molécules à effet antidiabétique, souvent associées entre elles (antidiabétique oraux) [Domus, 1998].

Si le traitement ne se révèle pas assez efficace, on est nécessaire d'utiliser de l'insuline malgré ces effets secondaires indésirables [Edelman, 1998].

Les médicaments oraux actuellement disponibles offrent un large spectre sur le plan de leur mécanisme d'action, mais ils ont un certain nombre de contre indications et d'effets indésirables [Virally et al, 2007].

Les sulfamides hypoglycémiantes :

Stimulent la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. Et inhibent l'efflux de la concentration de potassium intracellulaire crée une dépolarisation membranaire provoquant l'ouverture des canaux calcium voltage dépendant. C'est en définitive l'augmentation du calcium intracellulaire qui provoque la sécrétion d'insuline par le phénomène d'exocytose. [Allain, 2000 ; Larger, 1997].

Les biguanides :

Dont la seule forme commercialisée est la metformine qui n'agit pas sur la sécrétion insulinique mais une action exclusivement extra pancréatique consiste essentiellement :

- Une réduction de l'insulinorésistance en ralentissant la production de glucose par le foie ;
- Une augmentation de l'utilisation périphérique du glucose par les cellules cible ;
- Une réduction de la néoglucogenèse hépatique [**Larger, 1997 ; Wens et al, 2007**].

Les thiazolidinediones :

Améliorent la sensibilité à l'insuline dans les tissus adipeux et hépatiques. Ils agissent par l'intermédiaire du récepteur PPAR- γ au sein du noyau cellulaire. La stimulation de ce récepteur mène à l'expression ou à la suppression d'une série de gène qui jouent un rôle dans le métabolisme du glucose, des protéines et des lipides [**Yki-Jarvinen, 2004 ; Fonseca et al, 2000**].

Les inhibiteurs de l' α -glucosidase :

Inhibent le dernier stade de la digestion des sucres. Ceux qui ne peuvent pas être absorbés ; continuent leur périple dans l'intestin et subissent la fermentation colique bactérienne en acides gras volatiles où sont éliminés dans les selles [**Grimaldi, 1999 ; Duron et Heurtier, 2006**].

Plantes antidiabétiques

1-introduction :

Très tôt au cours de l'évolution, les hommes, pour se soigner, utilisèrent les ressources présentes dans leur environnement naturel. Les plantes tirent une place importante qui ne s'est jamais démentie, et il est tout à fait remarquable de constater que la plupart des plantes utilisées en thérapeutique de nos jours, ont été découvertes avant l'apparition des méthodes scientifiques d'exploration [Kassel, 1996].

Les pratiques de la médecine traditionnelle varient grandement d'un pays à l'autre et d'une région à l'autre, et sont influencées par des facteurs comme la culture, l'histoire, les attitudes et la philosophie personnelles. Pendant ces dernières années, le recours à la médecine traditionnelle s'est répandu partout dans le monde et a gagné en popularité. [OMS, 2000].

Leur rôle dans la recherche pharmaceutique et thérapeutique dans certaines régions du monde (chine, Inde, Afrique, Amérique Latin....) n'est plus à démontrer. Des stratégies de recherche - développement sont définies et conduites par des institutions internationales et gouvernementales et par des firmes pharmaceutiques en vue d'optimiser l'apport des plantes médicinales à la santé (S.F.E, 1993). Ces stratégies visent particulier :

- 1) à recenser le patrimoine existant, en culture des plantes, pour mieux le valoriser.
- 2) à promouvoir la cueillette et la culture des plantes médicinales.
- 3) A utiliser, par les populations, certaines plantes médicinales, dont les indications thérapeutiques sont confirmées par les recherches pharmacologiques et cliniques.
- 4) à produire des médicaments issus des plantes médicinales dont l'efficacité thérapeutique est prouvée.
- 5) A assurer l'exercice d'une phytothérapie clinique de qualité fondée sur une parfaite connaissance du terrain du malade et des indications thérapeutiques des phytomédicaments.
- 6) A renforcer les capacités de recherche et à intensifier d'informations [S.F.E, 1993].

De nombreux travaux obtenus dans le domaine de l'ethnopharmacologie, ils montrent que les plantes issues des médecines traditionnelles et qui ont été testées sont d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part ont quasiment été dépourvues de toxicité [Baghdkian et al, 1997].

2-Plantes antidiabétiques :

Depuis que l'occident dispose de l'insuline, On y pratique plus les traitements du diabète bien qu'ils soient au cœur des thérapies utilisées dans les régions sous développées [Clifford et al, 1989].

Plusieurs études ont confirmé les avantages des plantes médicinales avec des effets hypoglycémisants. Les effets de ces plantes peuvent retarder le développement des complications du diabète et corriger les anomalies métaboliques. En plus, pendant les dernières années quelques nouvelles molécules bio actives isolées a partir des plantes antidiabétiques montrent une activité antidiabétique plus efficaces que les agents oraux hypoglycémisants utilisés dans la thérapie clinique [Bnouham et al, 2006].

Plus 1123 espèces de plantes recensées par les ethnopharmacologues, sont expérimentées contre le diabète de type2. Ces plantes représentent 725 familles. 81% de ces plantes testées sur les animaux de laboratoire montrent une réduction de l'hyperglycémie [Marle et Farnsworth, 1996].

3-Etude de la toxicité:

Selon la durée, la fréquence et la quantité de produits toxiques auxquelles un individu est exposé, on observe plusieurs types de toxicités [Alain, 2002]. L'Homme est constamment exposé à une toxicité soit aiguë soit subaiguë ou encore chronique [Bismuth et al, 1987].

- Etude de la toxicité aiguë (Détermination de la dose létale DL100, DL50):

-La dose létale DL100 : C'est la dose qui entraîne la mort de la population des animaux d'essais. La DL100 est un indice de létalité qui mène à mentionner le degré de toxicité d'un produit chimique donné [Bonvalot, 2002].

-La dose létale DL50: La dose létale médiane est la valeur statistique de la dose d'une substance chimique qui provoque la mort de 50% des organismes d'une population donnée dans des conditions expérimentales définies [Laigneau, 2000].

C'est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après administration unique de la ou des substances actives contenues dans le médicament. Cette étude décrit les symptômes observés et fournit pour autant que cela soit possible l'indication de la dose létale 50 (DL50) [Ruckebusch, 1981].

Cette dose sert souvent de point de départ des études de toxicité, car elle fournit un minimum de connaissances [CSST, 2004].

L'étude sur les animaux de laboratoire doit porter sur un nombre égal de mâles et de femelles (Pour les rongeurs, chaque groupe doit comprendre au moins cinq animaux par sexe. Pour les autres espèces, chaque groupe doit comprendre au moins deux mâles et deux femelles). La durée de l'observation des animaux est fixée par l'expérimentateur. En général, elle n'est pas inférieure à une semaine [Ruckebusch, 1981; OMS, 2000].

- **Etude de la toxicité subaiguë et toxicité chronique :**

Toxicité subaiguë: Elle consiste à étudier les conséquences néfastes de l'administration répétée du produit étudié. Le produit est administré quotidiennement, une ou deux fois par jour, pendant une durée de 90 jours en général [Laroche, 2001 ; Montgomery, 1990].

Les expérimentations se font sur deux espèces de mammifère dont un rongeur et un non-rongeur (Pour les rongeurs, chaque groupe doit comprendre au moins dix animaux par sexe. Pour les autres espèces, chaque groupe doit comprendre au moins trois mâles et trois femelles) [Ruckebusch, 1981; OMS, 2000].

Les observations doivent porter sur l'aspect général, le comportement, la croissance et la mortalité. Dans certains cas, il peut être indiqué de faire une estimation de la quantité d'aliments consommés, d'étudier la chimie du sang et de l'urine, et de pratiquer des explorations fonctionnelles de certains organes. L'étude des organes doit comprendre un examen macroscopique et microscopique et la mesure des poids relatifs des organes dans les groupes d'épreuve et dans les groupes témoins. Dans de nombreux cas, les organes les plus importants à observer de façon détaillée sont le foie et le rein [Shubik et Sicé, 1956; Truhaut, 1956].

Toxicité chronique : Elle permet de caractériser le profil toxicologique d'une substance chez le rat, à la suite d'une exposition répétée et prolonger au-delà de 90 jours.

Dans ce cas, le produit est administré quotidiennement, une à deux fois par jour pendant 18 à

24 mois. Le protocole expérimental est similaire à celui utilisé pour la toxicité subaiguë, sauf que la période est plus longue [Laroche, 2001].

Il est habituel de mettre fin au bout de deux ans aux expériences à long terme sur les rats, car on considère ordinairement que cette durée couvre la plus grande partie de leur vie [Shubik et Sicé, 1956; Truhaut, 1956].

4- La recherche de la toxicité des plantes :

Un toxique, est une substance capable de perturber, immédiatement ou à terme, de façon passagère ou durable, le fonctionnement normal d'un organisme vivant, pouvant aller jusqu'à sa suppression complète et amener la mort [Viala et Botta, 2007].

La toxicité des plantes médicinales peut être liée à des mélanges de composés actifs qu'elles contiennent, leurs interactions avec d'autres herbes, les médicaments et les contaminants. Les plantes contiennent des mélanges complexes de terpènes, alcaloïdes, des saponines et autres substances chimiques. Ce qui augmente le risque de réactions indésirables par leurs effets additifs ou synergiques des interactions chimiques [Trevoux et al, 2000 ; Saad et al, 2006].

Les plantes contiennent des mélanges complexes de terpènes, alcaloïdes, des saponines et autres substances chimiques. Ce qui augmente le risque de réactions indésirables par leurs effets additifs ou synergiques des interactions chimiques [Trevoux et al, 2000 ; Saad et al, 2006].

Classiquement, en présence d'une substance inconnue la première étape dans la recherche d'une activité pharmacologique débute par l'étude de la toxicité et en particulier par l'évaluation de la dose létale 50 (DL 50), c'est-à-dire la dose qui provoque la mortalité de 50% des animaux. On administre ainsi, l'animal, rat ou souris, des doses de croissantes d'extraits jusqu'à l'obtention de la mortalité. [Rolland, 1988].

Cette technique, apporte néanmoins des renseignements de qualité :

- Elle détermine en premier lieu la toxicité de la substance ainsi que la marge thérapeutique, c'est-à-dire le rapport entre la dose active et la dose toxique pour l'espèce animale testée ; c'est une étape indispensable à l'utilisation de toutes substances à des fins thérapeutiques.
- L'observation des premiers symptômes de la toxicité rend compte des organes cibles, c'est-à-dire ceux qui sont préférentiellement atteints par le toxique ; la toxicité est

d'ailleurs un excellent critère d'orientation de la recherche d'activité pharmacologique [Rolland, 1988].

Deux techniques sont exploitées pour étudier l'effet toxique de l'extrait. Les techniques *in vivo* s'adressant à un animal entier vivant, particulièrement adaptée pour la mise en évidence d'un effet global. L'inconvénient majeur de ces techniques est l'utilisation d'un grand nombre d'animaux vivants qui ne servent que pour une seule expérimentation : chaque extrait est expérimenté à plusieurs doses, chaque dose représente un lot de 10 à 20 animaux : de plus il est nécessaire d'y adjoindre un lot témoin recevant un produit de référence. [Rolland, 1988].

Les techniques *in vitro*, dites de substitution, qui présente un premier avantage, celui de diminuer fortement la consommation d'animaux vivants, posent d'emblée un problème de fond : celui de la confrontation entre un mélange complexe, l'extrait, et un système simplifié réduit à une cellule ; d'autre part la réponse biologique diffère d'une cellule artificiellement isolé de son environnement normal par rapport à une cellule au sein d'un organe dans lequel elle maintient des interactions constantes avec les cellules voisines ou avec tout l'organisme [Rolland, 1988].

5- l'hémolyse :

L'hémolyse est le phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits et libèrent leur contenu hémoglobinique [Aguilar-Martinez, 2007].

Le globule rouge :

Le globule rouge, cellule mature de la lignée érythrocytaire, a la forme d'une lentille biconcave. Son diamètre est de 7 μm . La forme particulière du globule rouge lui permet d'avoir une plus grande surface par rapport à son volume que la forme sphérique, ce qui favorise les échanges d'oxygène. La durée de vie moyenne des globules rouges est de 120 jours [Aguilar-Martinez, 2007].

Hémolyse intratissulaire :

Les globules rouges âgés, après une durée de vie normale de 120 jours, sont phagocytés par les macrophages du système des phagocytes mononuclées. Chez le sujet normal, la majorité des globules rouges sont détruits dans les macrophages de la moelle osseuse (minimum 50%). Le reste de l'hémolyse se répartit dans l'organisme, en particulier dans la rate et le foie.

Cette phagocytose porte sur des globules rouges dont le vieillissement s'est traduit par :

- Des modifications biochimiques : diminution du contenu enzymatique, ralentissement métabolique, perte des lipides membranaires, phénomènes oxydatifs.
- Des modifications morphologiques (tendance à la sphérocité par réduction de la surface membranaire et/ou hyperhydratation).
- Des modifications de la plasticité (diminution de la déformabilité des globules rouges entraînant une stagnation dans les capillaires) [Aguilar-Martinez, 2007].

Hémolyse intravasculaire :

Une faible partie de l'hémolyse physiologique se déroule au sein même de la circulation sanguine. Dans ce cas, l'hémoglobine est libérée dans le plasma où elle forme un complexe avec l'haptoglobine, synthétisée par le foie. Ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'hémoglobine est dégradée. La taille du complexe haptoglobine-hémoglobine ne lui permet pas de traverser le glomérule rénal [Aguilar-Martinez, 2007].

Hémolyse pathologique :

Elle peut être due à deux mécanismes principaux:

- soit une anomalie du globule rouge : hémolyses corpusculaires ou globulaires
- soit à une agression extrinsèque des hématies : hémolyses extracorporelles [Aguilar, 2007].

Plantes étudiés

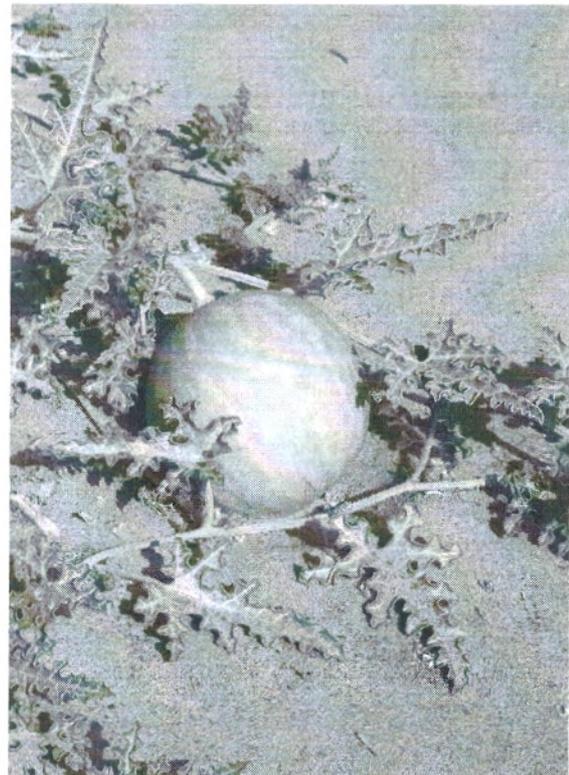
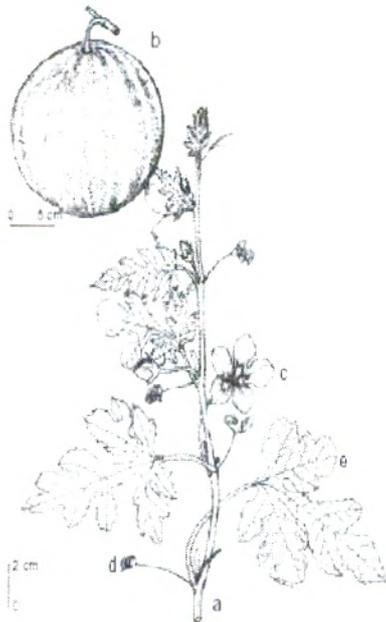
1-Citrullus colocynthis :

Figure 01: Coloquinte *Citrullus Colocynthis*.

a = rameau ; b = fruit ; c = fleur mâle; d = vrille; e = feuille [Zoro et al, 2003]

1-1présentation de la plante :

- Nom scientifique :

Citrullus colocynthis L. Schard, Linnæa 12: 414 (1838)

- Nom vernaculaires :

Arabe: Handal, Hadag, Handhal; Hantal, Hadjja;

Berber : Taberka, Tefersite, Tadjellet,

Français : coloquinte, chicotin

Anglais : Colocynth, bitter apple, bitter gourd, egusi [John et Cincinnati, 1898 ; Merad Chiali, 1973 ; Batanouny et al, 1999].

- **Taxonomie :**

| | |
|----------------|---------------------------|
| Règne | Végétale |
| Sous règne | plantes vasculaires |
| Super division | spermaphytes |
| Division | angiospermes |
| Classe | dicotylédones |
| Sous classe | dialypétales |
| Ordre | violales |
| Famille | cucurbitacées |
| Genre | <i>Citrullus</i> |
| Espèce | <i>Colocynthis</i> |

1-2-description botanique :

C'est une plante rampante, herbacée et vivace :

- Les tiges angulaires, rugueuses, rampantes ou migrantes et rudes ;
- Les feuilles de 5 à 10 cm de longueur, ont un limbe découpé en 5 à 7 lobes ;
- Les fleurs jaune verdâtre, monoïque à sexes séparés, solitaires, apparaissent l'été entre Mai et Août à l'aisselle des feuilles. La corolle de couleur jaune comporte cinq lobes ;
- Les fruits sphériques de 7 à 10 cm de diamètre, ressemblant à une petite pastèque, de couleur verte panachée de jaune clair, devient complètement jaune à maturité. La chair légère, spongieuse, de couleur jaune orangé. Une plante produit 15 à 30 fruits ;
- Les graines de petite taille (6mm de longueur), ovoïdes et aplaties, lisses, de couleur variant de l'orange au brun noirâtre et ont une saveur amère [**Feinbrun-Dothan, 1978 ; John et Cincinnat, 1898 ; Duke, 1983**]

1-3-usage traditionnel :

La coloquinte est fréquemment utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de différentes maladies :

- En application locale elle est très utile contre les hémorroïdes, soit seul ou associé à des fleurs de tabac [Abu Najm, 1992].
- La coloquinte préparée par décoction est utilisée comme insecticide elle est indiquée pour la destruction des puces. Aussi elle est utilisée en dermatologie contre la chute des cheveux [Abu Najm, 1992].
- En plus il présente une activité antipyrétique et carminative [Nmila, 2000].
- Les feuilles sont utilisées contre l'hémorragie. Elle est prescrite pour soulager les douleurs des membres inférieurs et les articulations [Yanive, 1999].
- Les racines peuvent également être employées comme purgative et contre les maladies urinaires et le rhumatisme [Ducke, 1978].
- Un groupe de l'université de Montpellier a fait une étude sur l'effet insulino-tropique de *Citrullus colocynthis*. Pour cela différents extraits de graines ont été réalisés et testés sur des rats de laboratoire [Nmila, 2000].
- Aussi des effets des extraits aqueux, glycosidiques, alcaloïdal, et de saponine de l'écorce de *Citrullus colocynthis* ont été étudiés chez des lapins normaux et diabétiques par une équipe de recherche irakienne. Les résultats obtenus suggèrent que l'extrait aqueux de l'écorce possède un effet hypoglycémiant [Abed Abdel-Hassan, 1999].

1-4-La toxicité de *Citrullus colocynthis* :

- Depuis les périodes bibliques, les fruits de la coloquinte sont considérés comme poison mortel [Yanif et al, 1999].
- La coloquinte est une plante irritante. Elle agit même à des doses modérées, produisant abondamment des évacuations aqueuses, des inflammations de la membrane muqueuse des intestins, des vomissements et des selles sanglantes.

- Les effets toxiques après utilisation chronique de cette plante, provoquent une hypokaliémie, oligurie et les œdèmes, semblable à une néphrite aiguë [**Hammouda et al, 2005**].
- Une étude sur la toxicité de coloquinte a été effectuée sur des moutons, révèle qu'une dose de 0,25 à 10g/kg de fruit et des feuilles frais provoquent l'hémorragie pulmonaire, l'entérite (inflammation des intestins), chute des poils et la diarrhée, la mort des moutons s'ensuit après 4 à 25 jours. (**Elaward, 1984**)

1-5-Composition chimique :

Le screening phytochimique de différentes parties de la coloquinte (racines, tiges, graines et feuilles) permet de caractériser les familles de composés chimiques existants dans la plante.

Les graines de coloquinte contiennent 26,6% d'huiles, 13,5% des protéines, 2,1% des cendres, 52,9% des fibres brutes, 4,9% d'azote libre et contient 322 mg/100g de potassium, 119 mg/100g de phosphore et 3,3 mg/100 g de fer [**Sawaya et al, 1986**].

Elles contiennent aussi la phytosteroline (ipurand), 2 phytostérols, 2 hydrocarbures, saponines, alcaloïdes, polysaccharides, glycosides, et des tanins, comme métabolites secondaires [**Duke, 1978**].

Le tableau 1 résume la composition en métabolite secondaire des différentes parties de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) :

Tableau 1 : Composition en métabolites secondaires des différentes parties de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*).

| Métabolites | Partie | Composés | Références |
|-------------|-----------------|---|-----------------------------------|
| Flavonoïdes | Fruits | isovitexine, iso-orientine 3'-methyl ether iso-orientine | [Maatooq et al, 1997] |
| | Partie aérienne | 8-C- <i>p</i> -hydroxybenzoyl- iso-vitexine, 6-C- <i>p</i> -hydroxylvitexine 8-C- <i>p</i> -hydroxybenzoyl- iso-vitexine 4' -O- glucoside | |
| Saponines | Fruits | 2-O-B-D glucopyranosyl cucurbitacine I, J, K et L | [Seger et al, 2005] |
| Glycosides | Fruits | 2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacine I, 2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacine E, 2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacine L 2-O-β-D-glucopyranosyl-(22-27) hexano cucurbitacine I | [Natiq et al, 1989] |
| | | trois flavone glycosides : isosaponarine, isovitexine et isoorientine 3'-O- méthyle éther; deux glycosides cucurbitacines : 2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacine I 2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacine L | [Delazar et al, 2006] |
| | | deux nouveaux glycosides triterpéniques cucurbitacines : colocynthosides A et B | Yoshikawa et al, 2007 |
| | Pulpe | α-élaterine-2-D-glycopyranoside | [El Khadem et Abdel-Rahman, 1963] |
| Alcaloïdes | Fruits | - une choline - dérivés de la pyridine : C ₁₀ H ₁₅ N O ₃ et C ₂₀ H ₃₂ NO - le dérivé de la pyridine ou de la quinoline : C ₁₆ H ₂₄ NO ₇ | [Darwish-Sayed et al, 1973] |

2- *Nerium oleander* :

Figure2 : *Nerium oleander* partie aérienne (feuilles et fleurs)

2-1-présentation de la plante :

- Nom scientifique :

Nerium oleander

- Nom vernaculaire :

Defla.

- *Nerium oleander* ou laurier-rose est un arbuste appartenant à la famille des Apocynacées. Le nom latin *Nerium* vient du grec **nerion** signifiant « humide », indiquant la prédilection de cette plante pour les zones humides. Nom spécifique *oleander* vient de l'italien de « oleandro » qui vient du latin « olea » qui désigne l'olivier faisant référence à la ressemblance des feuillages. [Paris et al, 1971].

- *Nerium oleander* est connu sous différentes dénominations communes selon les Pays et régions :

Nom anglais : rose-bay

Nom allemand : rosenlorbeer

Nom espagnol : laurel rosa

Nom italien : oleandro

Nom français : laurier rose

Nom arabe : el-defla الدفلة

- **Taxonomie :**

Selon la flore de l'Europe, le *Nerium oleander* est classé comme suit :

| | |
|----------|---------------------------|
| Règne | Végétale |
| Division | Angiosperme |
| Classe | Dicotylédone |
| Ordre | Gentianales |
| Famille | Apocynacées |
| Genre | <i>Nerium</i> |
| Espèce | <i>oleander L.</i> |

2-2Description botanique :

Arbuste dressé atteignant 3-4m de hauteur, possédant :

Feuilles : opposées ou verticillées par 3, longuement lancéolées (8-14 x 5-2.5cm), coriaces, à nervures secondaires pennées, très nombreuses, serrées.

Fleurs : en corymbes terminaux, ont une corolle infundibuliforme à gorge rose s'évasant en 5 lobes étalés et ornés d'un appendice à 3-4 dents courtes ; elles s'épanouissent de Juin à Septembre, sont de teinte rose ou blanche, disposées en corymbe [Delille, 2007].

Fruits : comporte deux follicules allongés (8-16 x 0.5-1.5cm), soudés jusqu'au début de la déhiscence.

Graines : duveteuse, sont surmontée d'une aigrette sessile qui en facilite la diffusion [Paris et al, 1971; Bruneton, 2001; Hussain et al, 2004].

2-3-usage traditionnel :

Nerium oleander est employé en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies et fait d'ailleurs partie de plusieurs pharmacopées [Adom et al, 2003; Almahy et al, 2006].

Les usages traditionnels des différents organes de *Nerium oleander* selon les pays sont décrits dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Principales utilisations de *Nerium oleander* en médecine traditionnelle selon les Pays

| Parties utilisées | Pays | Indications / (références) | Mode d'emploi |
|------------------------------|---------------------|---|---------------------------------|
| feuilles fraîches ou séchées | Afrique du sud | abortif [Adom et al, 2003] | non précis |
| | Algérie | nettoyage et assouplissement des pieds (peau), contre les caries dentaires [Maftah et al, 2003]. | décoction |
| | Iran | cardiotonique et diurétique [Adom et al, 2003]. | infusion |
| | Maroc | antidiabétique, abortif, démangeaison, male de tête [Bnouham et al, 2002], antigale, contre la chute des cheveux et l'eczéma [Oukal, 2008]. | Décoction, infusion, macération |
| | Tanzanie et Turquie | antibactérien [Erdemoglu et al, 2003; Adom et al, 2003]. | décoction |
| différents organes | Cuba | médecine de folklore [Adom et al, 2003]. | non précis |
| | Inde et Bangladesh | antibactérien (Adom et al, 2003) | non précis |

2-4-Toxicité du *Nerium oleander* :

- *Nerium oleander* est une plante toxique par ingestion de ces diverses parties (feuilles, fleurs, tiges,...). Sa toxicité envers l’homme, l’animal et certains insectes a fait l’objet de plusieurs études [Adom et al, 2003; Almahy et al, 2006 ; Barbosa et al, 2008].
- *Nerium oleander* étant plus souvent associé à des intoxications accidentelles chez les enfants ou même chez les animaux domestiques [Bruneton, 2001].Toutefois, des tentatives de suicide au *Nerium oleander* sont régulièrement colligées par les toxicologues dans différentes parties du globe [Bourgeois et al, 2005].
- L’empoisonnement peut être causé par l’ingestion d’une seule feuille verte ou séchée qui peut s’avérer mortelle pour un adulte. Les premiers signes de l’intoxication : inconscience, irritation de muqueuses, nausées, vomissement, douleurs abdominales, diarrhée, polypnée, troubles cardiaques graves, brûlure de la peau parfois signalée chez les sujets sensibles. Les symptômes apparaissent plusieurs heures (72 h) après l’ingestion d’une quantité toxique [Adom et al, 2003]. Les hétérosides cardiotoniques principaux constituants de *Nerium oleander* sont les toxiques reconnus à cette espèce [Bruneton, 2001].

2-5-Composition chimique :

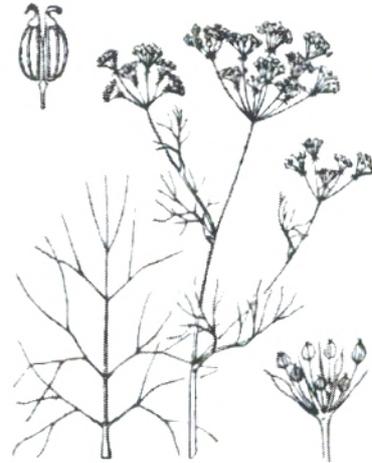
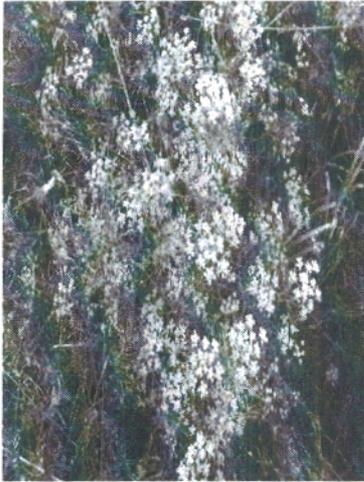
Le tableau 3 rassemble les constituants chimiques isolés des différentes parties de la plante :

Tableau3 : Constituants chimiques des différentes parties de *Nerium oleander*

| Parties utilisées | Groupe des substances/ (références) | Substances isolées |
|-------------------|---|--|
| Feuilles | Cardénolides [Hanson, 1985; Siddiqui et al, 1987; Bruneton, 1999; Begum et al, 1999]. | adynerin, folinerin, kaneroside, neriaside, neridiginoside, neritaloside, neriumoside, nerizoside,odorobioside-G-pentaacetate, odoroside-H, oleandrin,strospeptide, urechitoxin |
| | Triterpènes [Hanson, 1985; Siddiqui et al, 1989; Begum et al, 1997]. | acide butulinique, acide 12,13-dihydrrourosolique, acide isoneriucoumarique, acide oleanderolique, acide oleanolique, acide ursolique, acide neriucoumarique, acide kanerique, α - amyryn, betulin, |

| | | |
|-------------------|--|---|
| | | kanerocin, kanerodione, kanerin, kanerol, cis-karenin, trans-karenin, neriumin, neriuminin,oleanderen, oleanderol, uvaol. |
| | Prégnanes [Hanson, 1985]. | 3-O-β-gentiobiosyl-3β-14-dihydroxy-5α, 14β-pregnan-20-one. 21-O-β-D-glucosyl-14, 21-dihydroxy-14β-pregn-4-ene-3, 20-dione. 12-β-hydroxy-pregna 4,6-dien-3,20-dione. 12-β-hydroxy-pregna 4-en-3,20-dione. 12-β-hydroxy-16α-methoxy-pregna 4, 6-dien-3, 20-dione |
| Racines | cardénolides [Paris et al, 1971; Hanson, 1985; Huq et al, 1999]. | β-anhydroepidigitoxigenin ,12β-hydroxy-5β-carda-8, 14, 16, 20(22)-tetraenolide, 3β-hydroxy-5β-carda-8, 14, 16,20(22)-tetraenolide, 12β-hydroxy-5β-carda-8, 14, 16,20(22)-tetraenolide, neriumogenin-A-3β-D-digitaloside, neriumogenin-β, neriumoside A-1, neriumoside A-2, neriumoside B-1, neriumoside B-2, neriumoside C-1. |
| Écorces | | graciloside, neriodorein, neriodorin, odorobioside -K, odoroside-A, odoroside-B, 1-strophanthin. |
| Grains | | oleandrin, odorosides. |
| Différent parties | Cardénolides [Hanson, 1985]. | odoroside-D, odoroside-H, oleandrigenin, oleaside A, oleaside B, oleaside C, oleaside D, oleaside E, oleaside F. |
| | Flavonoides [Hanson, 1985]. | campherol-3rhamnoglucoside, quercetin, quercetin-3-rhamnoglucoside, rutin. |
| | Coumarines [Hanson, 1985]. | scopoletin, scopolin. |

3-Ammoides verticillata :



Figur 3 : *Ammoides verticullata* (partie aérienne)

3-1-Présentation de la plante :

- Nom scientifique :

Ammoides (ou *ptychotis*) *verticillata* (desf.) briq. [Quezel et Santa ; 1963].

Ammoides verticullata est une plante odorante qui pousse spontanément dans le nord de l'Afrique (Maroc, Algérie, Tunisie) ainsi qu'en Asie (Inde, Pakistan). On la trouve généralement dans les champs, les pelouses les montagnes et dans les forêts [Quezel et Santa, 1963].

- Nom vernaculaire :

Nunkha [Merrad, 1973].

Nunkha [Siljelmassi, 1991].

- **Taxonomie :**

D'après **Quezel et Santa (1963)**, **Guinochet et Vilmorin (1975)** l'espèce est classée comme suit :

| | |
|--------------------|---------------------|
| Embranchement | Phanérogames |
| Sous embranchement | Angiosperme |
| Classe | Dicotylédones |
| Sous classe | Dialypétales |
| Ordre | Ombellales |
| Famille | Ombellifères |
| Genre | <i>Ammoides</i> |
| Espèce | <i>verticillata</i> |

3-2-description botanique :

Ammoides verticillata est une petite plante annuelle, grêle, de 10 à 40cm, très ramifiées, à feuille très découpés : les inférieures pétiolées, à segments irrégulièrement divisés aigus, verticilles et les supérieures à segments plus ou moins linéaire à inflorescences en ombelles à 15 rayons (au plus), fruits ovoïdes, très petits d'environ 1mm de long [**Baba Aissa et al, 1999**] .

3-3-usage traditionnel :

- Les plantes appartenant à la famille des ombellifères ont une vaste utilisation dans différent domaine (condiments alimentaires, médecine traditionnelle.....) à cause de leurs propriétés thérapeutiques reconnus par les anciens. Est très utilisée dans les préparations culinaires (rôti, soupe, légumes) grâce à son arôme fort, mais elle est considérée principalement comme une plante médicinale pour traiter les maladies du tube digestif [**Abdoul-Jabar et al, 1989**].
- En Inde, elle a toujours été utilisée comme source de thymol utilisé contre la toux, l'irritation de gorge et dans le traitement de choléra [**Guenther, 1950**].

- Selon Ziyat *Ammoides verticillata* est une plante aromatique utilisée comme fébrifuge, conseillée contre la grippe et possède des propriétés thérapeutiques contre l'hypertension et le diabète [Ziyat et al, 1997].
- En outre, Merad avance que l'infusion d'*Ammoides verticillata* est utilisée comme antipyrétique, rafraichissante et antispasmodique [Merad, 1973].

3-4-Composition chimique :

L'étude phytochimique (tableau 4) d'*Ammoides verticillata* a montré une richesse en composés polyphénoliques de: flavonoïdes, anthocyanes et tanins avec une grande quantité dans les tiges et les fleurs, leucoanthocyanes n'existent pas dans les fleurs, saponines n'existent pas dans les tiges. Il n'y a pas alcaloïdes dans les tiges et les fleurs; les terpènes et les stéroïdes existent dans les tiges et les fleurs, mais avec une petite quantité [Bouazza et al, 2012].

Tableau 4 : l'étude phytochimique d'*Ammoides verticillata* [Bouazza et al, 2012]

| composant | tige | fleur |
|-----------------------|------|-------|
| Flavonoïdes | +++ | ++ |
| Saponines | - | + |
| Anthocyanes | +++ | ++ |
| Terpènes et stéroïdes | ++ | + |
| Tanins | +++ | +++ |
| Leucoanthocyanes | ++ | - |
| Alcaloïdes | - | - |

Matériel et méthodes

Chapitre 1 : analyses phytochimiques

Ce travail est réalisé au laboratoire : Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique, département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen.

1-Matériel végétal

1-1-La coloquinte (*Citrullus colocynthis*) :

Les fruits de la coloquinte (*Citrullus colocynthis* L. Schard); famille des cucurbitacées ; sont récoltés à maturité durant le mois de septembre dans la région de Ain Safra, Wilaya de Naâma, Sud-ouest algérien.

Au laboratoire, les graines sont récupérées à partir des fruits et mises à sécher à l'abri de la lumière. Les graines séchées sont ensuite broyées en poudre fine à l'aide d'un moulin à café.

1-2-laurier rose (*Nerium oleander* L):

Les feuilles de laurier rose (*Nerium oleander* L) ; famille apocynacées ; sont récoltes durant le mois de février dans la région de Beni-Snousse, Wilaya de Tlemcen, Ouest algérien.

Elles sont mises à sécher et conserver à l'abri de la lumière, ensuite sont découpées en petites morceaux à l'aide d'un ciseau pour des tests phytochimiques et biologiques.

1-3- Nounkha (*Ammoides verticullata*) :

Ammoides verticullata ; famille des ombellifères elle récoltés à maturité durant le mois d'avril dans la région de Beni-Snousse, Wilaya de Tlemcen, Ouest algérien.

La partie aérienne est récupérée à partir de la plante et mise à sécher à l'abri de la lumière, et en suite elle est broyée.

2-Screening phytochimique

Les tests phytochimiques sont des tests qualitatifs qui permettent de caractériser les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques.

2-1-Préparation des extraits :**➤ Décoction en milieu aqueux :**

- Dans un ballon rodé, surmonté d'un réfrigérant. Mélanger 10 g du matériel végétal avec 100 ml d'eau distillée ;
- Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 1 heure, dans une plaque chauffante plus agitateur.
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

➤ Décoction en présence des solvants :**1-En milieu hydroalcoolique (méthanol-eau 70/30) :**

- Dans un ballon rodé, surmonté d'un réfrigérant. Mélanger 10 g du matériel végétal avec 70 ml de méthanol et 30 ml d'eau distillée ;
- Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 45 min, dans une plaque chauffante plus agitateur.
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

2-En milieu chloroformique :

- Dans un ballon rodé, surmonté d'un réfrigérant. Mélanger 5 g du matériel végétal avec 50 ml de chloroforme;
- Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 45 min, dans une plaque chauffante plus agitateur.
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

➤ Infusion en milieu aqueux :

- Verser 100 ml d'eau distillée bouillante sur 10 g du matériel végétal ;
- Agiter et laisser le mélange refroidir ;
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

➤ Macération en milieu aqueux :

- Macération sous agitation, à température ambiante, pendant 24 heures, de 10 g du matériel végétal dans 100 ml d'eau distillée ;
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

➤ **Macération en milieu acide :**

- Macération sous agitation, à température ambiante, pendant 24 heures, de 10 g du matériel végétal dans 100 ml d'HCl 2% ;
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

2-2-Tests phytochimiques :

Les tests sont portés sur la recherche des principaux groupes chimiques (alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, saponines, coumarines, stérols et triterpènes, composés réducteurs,...) par des réactions en tubes. En utilisant les procédures standard telles que décrites par **Trease et Evans (1989) et Harborne (1998)**.

Les résultats ont été évalués comme suit : +++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif ; ND : non déterminé.

➤ **Les alcaloïdes :**

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer, et de Wagner.

Prendre 1 ml de l'extrait à analyser dans 2 tubes à essai et ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube, 5 gouttes du réactif de Wagner dans le second tube, l'apparition d'un précipité blanc, brun, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes.

➤ **Les substances polyphénoliques :**

❖ **Les tanins :**

Dans un tube à essai, introduire 5 ml d'extrait à analyser et ajouter 1 ml de solution aqueuse de FeCl₃ à 1 %. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

❖ **Les Flavonoïdes :**

A 5 ml d'extrait à tester, ajouter, 1 ml d'alcool iso amylique, quelques copeaux de magnésium et quelques gouttes d'acides chlorhydrique (HCl), l'apparition d'une coloration rose ou rouge indique la présence des flavonoïdes.

➤ **Les saponines: Indice de mousse**

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire respectivement 1, 2, 3, ..., 10 ml de la solution à analyser préparée par décoction en milieu aqueux, hydroalcoolique ou par infusion. Ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Agiter chaque tube dans le sens de la longueur du tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. Laisser reposer 15 min et mesurer l' hauteur de la mousse produite dans chaque tube.

L'indice de mousse (**I**) est calculée par la formule suivante : $I = 1000 / N$

N est le numéro du tube où la hauteur de mousse est égale à 1 cm.

➤ **Les coumarines : Fluorescence UV**

Introduire 2 ml d'extrait dans un tube, ajouter 0,5 ml de NH_4OH à 25 %. Mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

➤ **Stérols et triterpènes : La réaction de Liebermann Buchard**

Introduire 10 ml de la solution à analyser dans un bécher, ajouter 5 ml d'anhydride acétique puis 5 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette ajouter 1 ml de H_2SO_4 concentré sur la paroi du bécher sans agiter. Laisser reposer 30 minutes. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes.

➤ **Anthraquinones libres: Réaction de Bornträger**

Introduire dans un tube à essais 1 ml d'extrait chloroformique préparé, ensuite ajouter 1 ml de NH_4OH dilué puis agiter. La coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

➤ **Les composés réducteurs :**

Introduire 2 ml d'extrait dans un tube, ajouter 2 ml de liqueur de Fehling (1 ml réactif A et 1 ml réactif B) et incuber l'ensemble 8 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

Chapitre2 : analyses biologiques

Évolution de l'effet hémolytique :

Les tests d'activité hémolytique des extraits hydroalcoolique des trois plantes (les graines de *Citrullus colocynthis*, les feuilles de *Nerium oleander* , et la partie aérienne d'*Ammiodes verticillat'*) ont été réalisés *in vitro* sur une suspension d'érythrocytes du sang humain dans le tampon phosphate buffered saline.

1-Préparation du PBS (phosphate buffered saline) à pH=7,4±0,02

Nous avons préparé 1 litre d'une solution tampon phosphate salé (PBS) par l'utilisation des composés suivants avec les concentrations qui correspondent : NaCl (137mM), Kcl (2,7mM), Na₂HPO₄ (8mM), KH₂PO₄ (2mM) [Mohan, 2006].

2-Prélèvement du sang :

Le sang est prélevé sur des tubes héparine à partir d'un donneur unique et sain.

3-Préparation de la suspension érythrocytaire :

Du sang fraîchement prélevé sur des tube héparine est centrifugé à 3000 tour /minutes, après élimination du surnageant le culot est lavé 2 fois par PBS puis suspendu à nouveau dans ce même volume que le surnageant éliminé.

4-préparation des extraits :

Différentes concentration d'extraits ont été utilisées (5mg/ml, 10mg/ml, 15mg/ml, et 20mg /ml) à partir d'une solution mère de 200mg de poudre solubilisé dans 10ml de PBS.

5- l'effet hémolytique :

Le test d'effet hémolytique des trois plantes étudiées est réalisé selon la méthode de [Guo-Xiang Li et Zai-Qun Lui, 2007]

- Mettre dans des tubes à hémolyse, 1980 µl de la suspension érythrocytaire préparée avec 20 µl de l'extrait à différentes concentrations (5, 10, 15, et 20 mg/ml) ;
- Incuber les tubes dans l'étuve à 37°C durant 45min ;
- Prélever 500 µl chaque 15min ;
- Ajouter 1,5 ml de PBS ;
- Mélanger les tubes délicatement ;

- Arrêter la réaction avec un bain glaçon ;
- Centrifuger les tubes à 2000 tour par minute durant 5 min ;
- Lire l'absorbance de chaque tube à 548nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible double-faisceau (SPECORD® 200 PLUS, Analytique Jena), contre un blanc contenant du PBS.

Un tube témoin négatif est préparé dans les mêmes démarches expérimentales. Il est composé de 500 µl de suspension érythrocytaire et 1500 µl de solution tampon de PBS, en absence d'extrait.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, préparé un tube d'hémolyse totale qui contient 250 µl de la suspension érythrocytaire et 4750 µl d'eau distillée, en absence d'extrait. Assurer le maximum d'hémolyse à l'aide d'un vortex.

Suivre les mêmes conditions (temps d'incubation, température et pH) et les mêmes démarches expérimentales.

Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, après 45 min d'incubation, selon la formule suivant :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{\text{DO (extrait 45 min)} - \text{DO (témoin négatif 45 min)}}{\text{DO (hémolyse totale 45 min)}} \times 100$$

Résultats et Interprétation

Chapitre 1 : screening phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur trois plantes récoltées à l'ouest algérien : graines de *Citrullus colocynthis*, feuilles de *Nerium oleander*, la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*.

Les extraits sont préparés dans différents solvants (eau, chloroforme) par décoction, infusion, et macération.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux des plantes étudiées. La détection de ces métabolites est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur ou un examen sous la lumière ultraviolette. Les résultats sont présentés dans les tableaux 5, 6, et 7.

1-Citrullus colocynthis :

Tableau 5 : Tests phytochimiques des extraits aqueux et chloroformique des graines de *Citrullus colocynthis* préparés par décoction, infusion et macération.

| Les tests phytochimiques | | <i>Citrullus colocynthis</i> | | |
|--------------------------|------------------------------|--------------------------------------|----------|------------|
| | | Les extraits aqueux | | |
| Métabolites secondaires | réactifs | Décoction | Infusion | Macération |
| Alcaloïdes | Mayer | + | + | + |
| | Wagner | +++ | +++ | +++ |
| Tanins | FeCl ₃ | ++ | + | - |
| Flavonoïdes | Mg ⁺⁺ | - | - | - |
| Saponines | Indice de mousse | 200 | 166.666 | 250 |
| Coumarines | Fluorescence UV | - | - | - |
| Stérols et triterpènes | Réaction Liberman et Buchard | + | + | + |
| Les composés réducteurs | Liqueur de Fehling | + | + | + |
| | | L'extrait chloroformique (décoction) | | |
| Anthraquinones libres | Réaction de Boontrager | + | | |

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif

Les résultats obtenus montrent que les graines de notre plante sont riches en alcaloïdes, tanins, et à un degré moins les glycosides, saponines, composés réducteurs et les anthraquinones libres. D'autre part, on note l'absence des flavonoïdes, et des coumarines.

2-Nerium oleander :

Tableau 6 : Tests phytochimiques des extraits aqueux et chloroformique des feuilles de *Nerium oleander* préparés par décoction, infusion et macération.

| Les tests phytochimiques | | <i>Nerium oleander</i> | | |
|--------------------------|------------------------------|--------------------------------------|----------|------------|
| | | Les extraits aqueux | | |
| Métabolites secondaires | réactifs | Décoction | Infusion | Macération |
| Alcaloïdes | Mayer | - | - | - |
| | Wagner | ++ | ++ | ++ |
| Tanins | FeCl ₃ | ++ | ++ | ++ |
| Flavonoïdes | Mg ⁺⁺ | + | ++ | - |
| Saponines | Indice de mousse | 111.111 | 111.111 | 200 |
| Coumarines | Fluorescence UV | ++ | ++ | - |
| Stérols et triterpènes | Réaction Liberman et Buchard | ++ | ++ | ++ |
| Les composés réducteurs | Liqueur de Fehling | + | + | + |
| | | L'extrait chloroformique (décoction) | | |
| Anthraquinones libres | Réaction de Boontrager | +++ | | |

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif

Les résultats obtenus montrent que les feuilles de notre plante sont riches en anthraquinones libres, tanins, glycosides, coumarines et flavonoïdes, et à un degré moins les saponines, et les composés réducteurs.

Le test des alcaloïdes n'a été pas confirmé, puisque nous avons noté un test positif avec le réactif de Wagner et négatif avec le réactif de Mayer.

3-*Ammoides verticillata* :

Tableau 7 : Tests phytochimiques des extraits aqueux et chloroformique de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* préparés par décoction, infusion et macération.

| Les tests phytochimiques | | <i>Ammoides verticillata</i> | | |
|--------------------------|------------------------------|--------------------------------------|----------|------------|
| | | Les extraits aqueux | | |
| Métabolites secondaires | réactifs | Décoction | Infusion | Macération |
| Alcaloïdes | Mayer | - | - | - |
| | Wagner | +++ | +++ | +++ |
| Tanins | FeCl ₃ | +++ | +++ | +++ |
| Flavonoïdes | Mg ⁺⁺ | +++ | +++ | +++ |
| Saponines | Indice de mousse | 100 | 100 | - |
| Coumarines | Fluorescence UV | - | - | - |
| Stérols et triterpènes | Réaction Liberman et Buchard | + | + | + |
| Les composés réducteurs | Liqueur de Fehling | +++ | +++ | +++ |
| | | L'extrait chloroformique (décoction) | | |
| Anthraquinones libres | Réaction de Boontrager | ++ | | |

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif

Les résultats obtenus montrent que la partie aérienne de notre plante sont riches en, tanins, flavonoïdes, composés réducteurs, et anthraquinones libres, et à un degré moins les Saponines, et glycosides. D'autre part, on note l'absence des coumarines.

Le test des alcaloïdes n'a été pas confirmé, puisque nous avons noté un test positif avec le réactif de Wagner et négatif avec le réactif de Mayer.

Chapitre 2 : effets hémolytiques

Les tests biologiques ont été réalisés sur les extraits hydroalcooliques préparés par décoction, à partir des graines de *Citrullus colocynthis*, des feuilles de *Nerium oleander* et la partie aérienne d'*Ammiodes verticillata*.

Les figures 4,5 et 6 présentent l'évolution des taux d'hémolyse, par absorbance, durant 45 min, dans un milieu tampon PBS (pH 7,4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations des plantes étudiées (5, 10, 15, et 20 mg/ml), préparées par décoctions hydroalcooliques Méthanol/eau (70/30), comparé à un témoins négatifs (tube contenant que de PBS et suspension érythrocytaire).

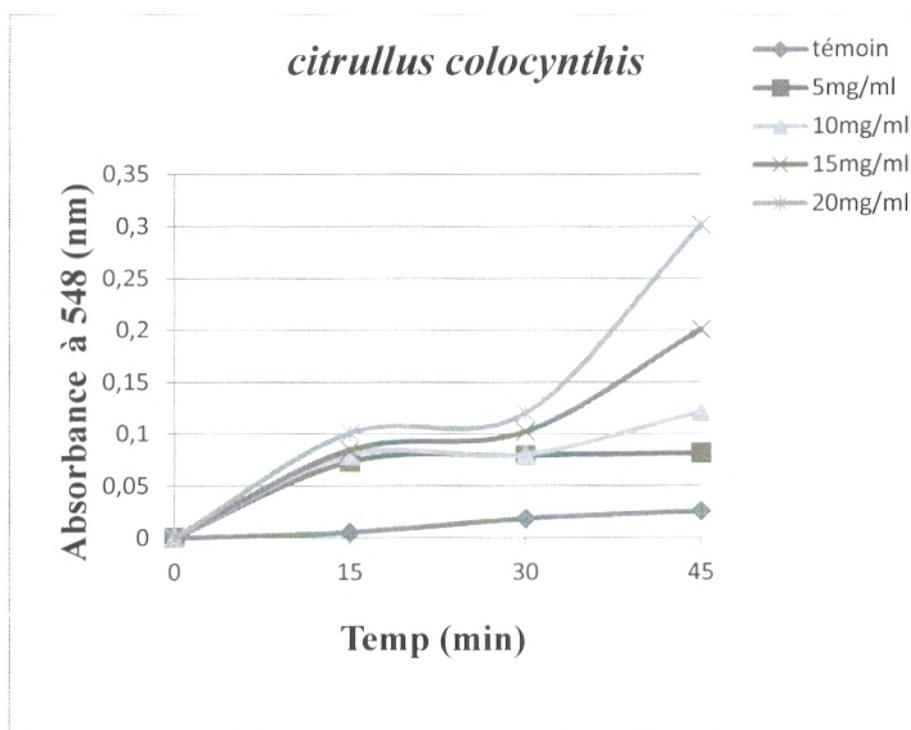


Figure 4 : L'évolution de l'absorbance des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait des graines de *Citrullus colocynthis* incubée à 37°C durant 45 min à 548 nm.

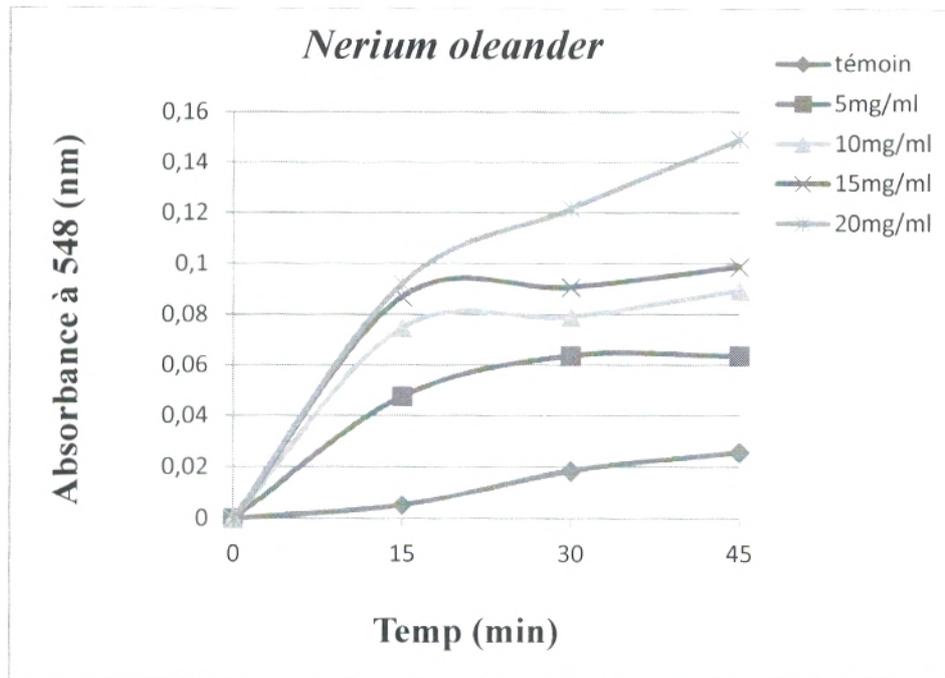


Figure 5 : L'évolution de l'absorbance des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait des feuilles de *Nerium oleander* incubée à 37°C durant 45 min à 548 nm.

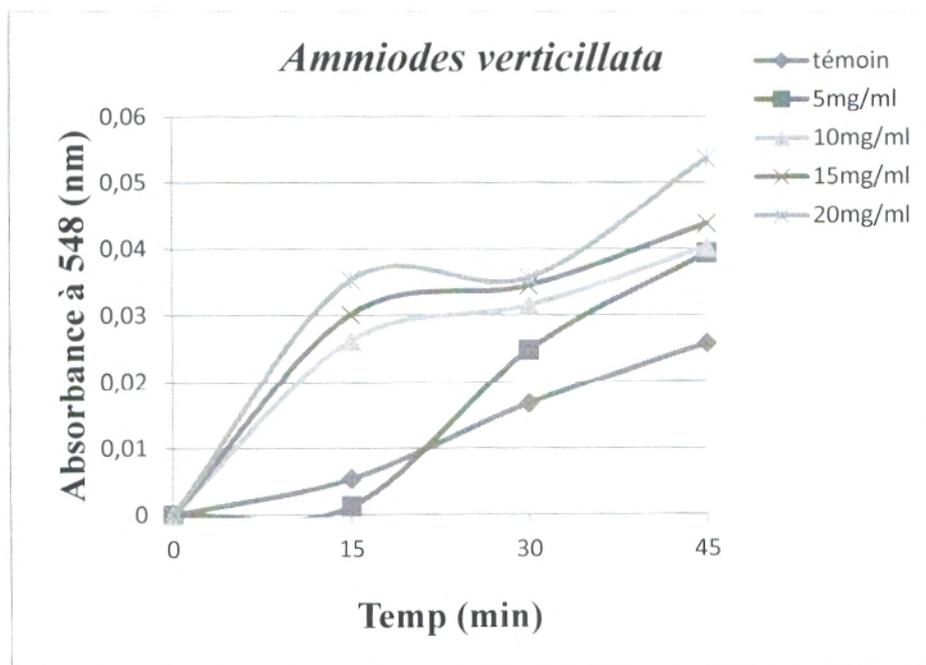


Figure 6 : L'évolution de l'absorbance des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait de la partie aérienne d'*Ammiodes verticillata*. Incubée à 37°C durant 45 min à 548 nm.

D'après, les résultats obtenus des extraits de *Citrullus colocynthis*, *Nerium oleander* et *Ammiodes verticillata*, nous avons enregistré l'augmentation d'hémolyse dans le temps et en augmentant les concentrations des extraits.

A une concentration de (5mg/ml) de l'extrait de *Citrullus colocynthis*, l'absorbance a passé de (0.0733) après 15 min d'incubation à (0.0817) à la 45^{ème} minute. Cette absorbance est plus élevée à une concentration de 20mg/ml qui a touché 0.3021 à la 45^{ème} minute (figure4).

De même à une concentration de (5mg/ml) de l'extrait de *Nerium oleander*, l'absorbance a passé de (0.0476) après 15 min d'incubation à (0.0563) à la 45^{ème} minute. Cette absorbance est plus élevée à une concentration de 20mg/ml qui a touché 0.1491 à la 45^{ème} minute (figure5).

Et pour l'extrait d'*Ammiodes verticillata*, a la concentration de (5mg/ml), l'absorbance passé de (0.0013) après 15 min d'incubation à (0.0258) à la 45^{ème} minute. Cette absorbance est plus élevée à une concentration de 20mg/ml qui a touché 0.0537 à la 45^{ème} minute (figure6).

Ces valeurs sont largement supérieure à ceux de témoin négatif (0 ; 0.0054 ; .0186 et 0.0258) à 0, 15, 30 et 45 min.

Les figure 7, 8 et 9 montrent l'évolution de taux d'hémolyse (en pourcentage à 45 minutes) pour les différentes concentrations des extraits de *Citrullus colocynthis*, *Nerium oleander* et *Ammiodes verticillata*, par rapport le taux d'hémolyse total des érythrocytes incubé dans un milieu hypotonique contenant de l'eau distillée.

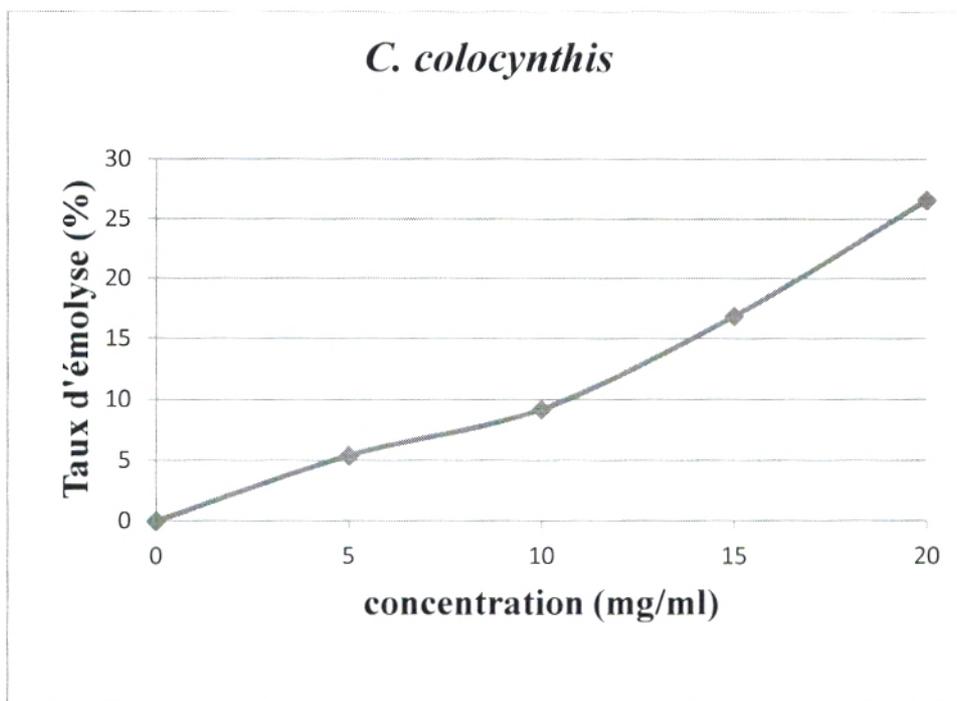


Figure7 : Evolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations de *Citrullus colocynthis* après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

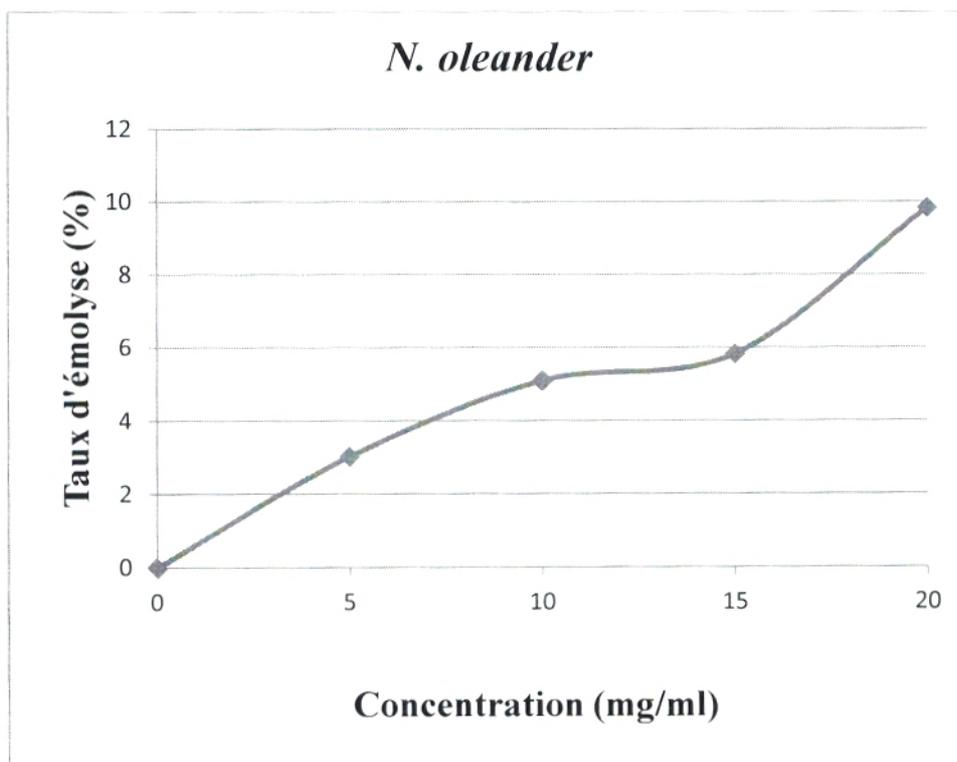


Figure 8 : Evolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations de *Nerium oleander* après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

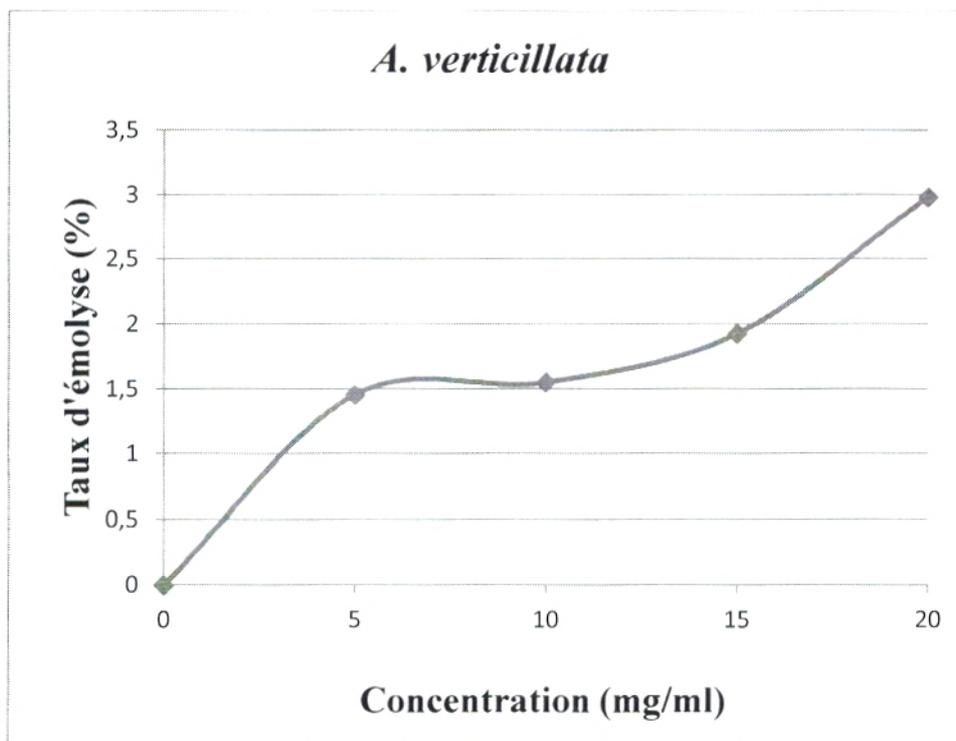


Figure 9 : Evolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations d'*Ammiodes verticillata* après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

D'après les résultats des extraits des trois plantes étudiées nous avons enregistré que le pourcentage de l'effet hémolytique croît par rapport à l'augmentation de la concentration de l'extrait, nous avons constaté que l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration d'extrait.

La figure 10 présente une comparaison des taux d'hémolyse en pourcentage des trois plantes (*Citrullus colocynthis*, *Nerium oleander* et *Ammiodes verticillata*) après 45 minutes d'incubation à différentes concentrations d'extraits.

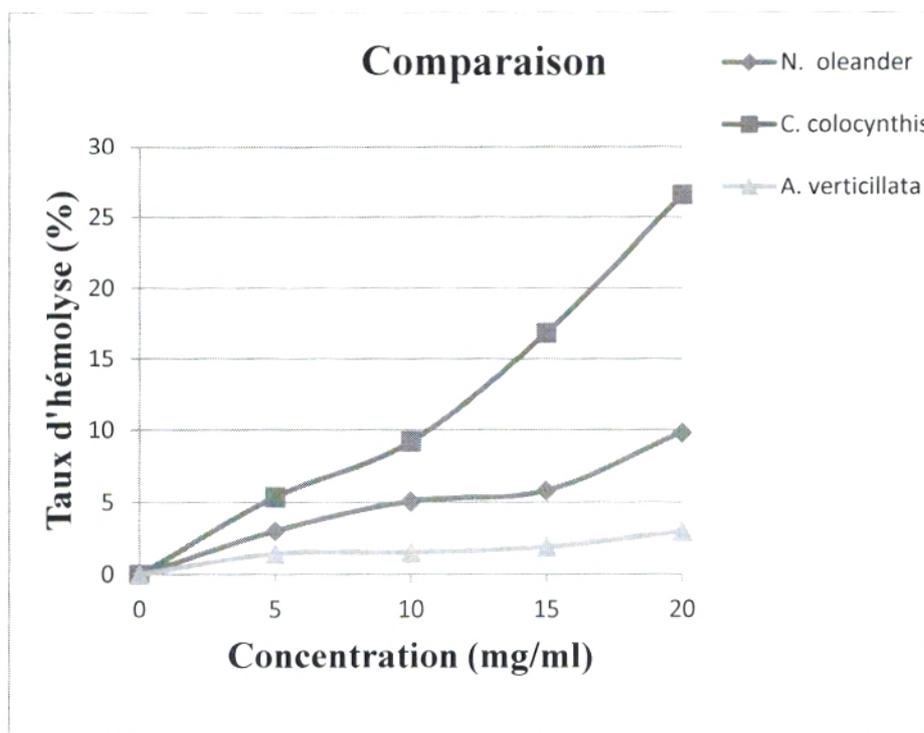


Figure 10: Evolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations des trois plantes étudiées après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

En comparaison, nous avons constaté que l'extrait d'*Ammoides verticillata* présente un effet hémolytique très moindre par rapport aux extraits de *Citrullus colocynthis* et *Nerium oleander* avec un taux d'hémolyse comparé à l'hémolyse total égale à 2,98% ; 9,84% et 26,61% d'*Ammoides verticillata*, *Nerium oleander*, et *Citrullus colocynthis* respectivement.

Discussion générale

Depuis les temps anciens, les plantes médicinales ont été largement utilisées par les populations pour contrôler les maladies chroniques [**Jouad, 2000 ; Jouad et al, 2001**]. Parmi ces maladies chroniques le diabète sucré, Le diabète sucré, principalement le diabète de type 2, est considéré depuis quelques années comme un des fléaux du troisième millénaire, partout dans le monde, dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement. Le nombre de personnes atteintes de diabète ne cesse de croître de façon très alarmante. On comptait 366 millions de diabétiques en 2010 et 552 millions sont attendus en 2030 [**Whiting, 2011**].

L'impact de cette pathologie sur les systèmes de santé est très lourd à travers les pertes humaines, aux coûts liés aux traitements, à la prise en charge et aux complications.

Le traitement actuels du diabète de type 2 vise à soigner et non à guérir la maladie. Il repose, d'une part, sur l'amélioration de la sensibilité à l'action de l'insuline par l'activité physique régulière, les mesures diététiques et les médicaments insulinosensibilisateurs, d'autre part, sur l'amélioration de la sécrétion d'insuline par les médicaments insulinosécréteurs. De plus, le traitement peut comprendre une adjonction d'insuline [**Charbonnel et al, 1997**].

En plus des traitements conventionnels commercialisés dans le marché, la population mondiale se tourne de plus en plus vers les plantes médicinales pour soulager cette maladie.

Plus de 1200 plantes ont été inventoriées comme antidiabétiques dans le monde, mais seulement quelques-unes ont été évaluées scientifiquement [**Ivorra et al, 1989; Li et al, 2004**]. Ces plantes représentent 725 genres et 183 familles [**Marles et Farnsworth, 1996**].

Bnouham et al, en 2006, ont recensé 176 espèces plantes intégrées dans 84 familles à pouvoir antidiabétique clair, étudiées et reportées dans la littérature entre 1990 et 2000.

Allali et al, en 2008, ont dénombré 56 plantes antidiabétiques utilisées par la population de l'Ouest d'Algérie. De même, **Benmehdi en 2000**, a enregistré dans son enquête ethnobotanique 80 plantes traditionnellement utilisées pour traiter le diabète dans la région de Tlemcen (Algérie).

Azzi et al (2012), ont cité 60 plantes médicinales antidiabétiques appartenant à 32 familles, recensées dans quatre Wilaya de l'Ouest et Sud-Ouest algérien. Parmi ces plantes nous citons : *Ajuga iva (L.)*, *Marrubium vulgare (L.)*, *Citrullus colocynthis (L.)*, *Nerium oleander (L.)*, *Eucalyptus globulus...*, ces plantes sont aussi reconnues par leurs effets toxiques.

Ce qui nous à mener d'étudier la composition chimiques et l'effet hémolytiques de trois plantes dite antidiabétique : *Citrullus colocynthis*, *Nerium oleander* et *Ammodendron verticillata*.

Citrullus colocynthis est largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement du diabète sucré, par plusieurs modes d'utilisation [**Lev et Amar, 2002 ; Said et al, 2002**], pieds trompés pendant 1 h dans le décocté de fruit frais coupé en tranche ; consommation de la poudre de l'épicarpe séché et mélangé avec les aliments, utilisation sublinguale de 1 à 2 graines séchées par jour et rarement prise orale de l'infusion de fruit [**Jouad et al, 2001 ; Merzouki et al, 2000**].

Les tests phytochimiques effectués sur les différents extraits préparés, par décoction, infusion ou macération dans différents solvants (eau, et chloroforme), des graines de *Citrullus colocynthis* broyées et dégraissées, a révélé la présence des alcaloïdes, tanins, glycosides et composés réducteurs. De même nous avons noté l'absence des flavonoïdes, saponosides et des coumarines. Ces résultats sont en accord avec le dépistage phytochimique qualitatif de l'extrait éthanolique des graines de *Citrullus colocynthis* réalisé par **Najafi et al en 2010**, qui ont noté la présence des alcaloïdes et des glycosides. Mais aussi les flavonoïdes absents dans notre étude.

Nerium oleander est un arbuste appartenant à la famille des Apocynacées, est une plantes très réponsus dans notre région, est Malgré sa toxicité établie, l'espèce *N. oleander* est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies et fait d'ailleurs partie de plusieurs pharmacopées populaires [**Adom et al, 2003**].

Les tests phytochimiques effectués sur les différents extraits préparés, par décoction, infusion ou macération dans différents solvants (eau, et chloroforme), des feuilles *Nerium oleander* a révélé la présence des anthraquinones libres, tanins, glycosides, coumarines et flavonoïdes, et à un degré moins les saponines et les composés réducteurs. Ces résultats sont

confirmés par l'étude phytochimique effectuées sur cette plante qui a permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les cardénolides, tritèrènes, prégnanes, flavonoïdes, coumarines et des dérivés stéroïdiques [Hanson, 1985].

Ammiodes verticillata est une petite plante annuelle, odorante, appartenant à la famille des ombellifères. Selon Ziyat cette plante est une plante aromatique utilisée comme fébrifuge, conseillée contre la grippe et possède des propriétés thérapeutiques contre l'hypertension et le diabète [Ziyat et al, 1997].

Les tests phytochimiques effectués sur les différents extraits préparés, par décoction, infusion ou macération dans différents solvants (eau, et chloroforme), de la partie aérienne d'*Ammiodes verticillata* a révélé la présence des tanins, flavonoïdes, composés réducteurs et anthraquinones libres, et à un degré moins les saponines et les glycosides. Ces résultats sont confirmés par Bouazza et al en 2012.

Les tests de la toxicité permettent d'évaluer les risques liés à l'exposition à une substance chimique particulière, et l'obtention des informations sur les caractéristiques de cette substance [Diezi, 1992].

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives et quantitatives. En fonction de la durée de l'étude et de la dose administrée [Agbor et al, 2005].

Pour notre analyse biologique, nous avons enregistré une augmentation de taux d'hémolyse en augmentant les concentrations des extraits étudiés.

Le taux d'hémolyse est très élevé pour l'extrait de *Citrullus colocynthis* avec un taux d'hémolyse de 26,61 % à une concentration de 20 mg/ml.

Cette toxicité est probablement due à la richesse de cette plante en alcaloïdes. De même c'est une plante reconnue dans la littérature par sa toxicité, citons les travaux de [Elawad et al, 1984 ; Hassananne et al, 2001 ; Al Yahia et al, 2000; Adam et al, 2001 ; Ott et al, 2003].

Pour l'extrait de *Nerium oleander*, Le taux d'hémolyse est de 9,84% à une concentration de 20 mg/ml. Cette plante est une plante toxique par ingestion de ces diverses parties (feuilles,

fleurs, tiges,...). Sa toxicité envers l'homme, l'animal et certains insectes a fait l'objet de plusieurs études [Adom et al, 2003; Almahy et al, 2006 ; Barbosa et al, 2008].

Contrairement pour l'extrait d'*Ammiodes verticillata* nous avons enregistré un taux d'hémolyse de 2,98% à une concentration de 20 mg/ml. Ce qui peut produire une faible toxicité.

L'étude *in vitro* sur l'effet hémolytique de ces trois plantes antidiabétiques a enregistré un taux d'hémolyse après 45 minutes d'incubation à des concentrations différentes.

Mais cette étude reste préliminaire et il faut d'autres études complémentaires approfondies qui se résument dans les points suivants :

- Séparation, identification et caractérisation des composés actifs dans les trois extraits par des méthodes d'analyses.
- Etude de la cytotoxicité des extraits face aux érythrocytes isolés ; en étudiant l'influence de ces extraits sur la pompe Na^+/K^+ .
- Utilisation de différentes techniques *in vivo* (effet antidiabétique sur les animaux de laboratoire et étude toxicologique aiguë et chronique).

Conclusion générale

A la lumière des résultats figurés dans ce mémoire, on peut conclure que les plantes : *Ammiodes verticillata*, *Citrullus colocynthis* et *Nerium oleander* sont très riches en métabolites secondaires tels que les tanins, glycosides, saponines, flavonoïdes, alcaloïdes...etc.

Les tests biologiques réalisés *in vitro* sur le sang humain prouvent un effet hémolytique des plantes étudiées à des concentrations différentes (5mg/ml, 10mg/ml, 15mg/ml et 20mg/ml).

Ce travail reste préliminaire et pas indicatif sur le mécanisme réel par lequel agit l'extrait méthanolique sur des érythrocytes isolés du sang humain. Par conséquent, la réalisation d'une étude suivante sur des hématies pour mieux comprendre le mode d'action de la pompe Na^+/K^+ est très importante.

L'accomplissement d'une étude toxicologique est une étape importante afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et de mieux identifier les sites d'action des substances actives.

La contribution à la recherche d'effet hémolytique à partir de l'extrait méthanolique reste introductive. Celle-ci consiste à une estimation d'une hypothétique d'activité cytotoxique *in vivo*.

Références bibliographiques

Abdel-Hassan I., Abdel-Barry J.A., Mohammeda S.T., 1999. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.*; 71: 325-330.

Addoul-Jabbar, Rias A, Kausaef, Ashraf M, 1989. Antimicrobiol activity of essential oil of carum roseburghianum (Bal-A jowan) .Univ. of Agric. Faisalabad, 405-409.

ADA (American Diabetes Association), 1997. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*; 21 (sup.1): 5-19.

ADA (American Diabetes Association), 2008. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 31(1): S55-S60.

Adam S. E. I, Al-Yahya M. A, Al-Farhan A. H; 2001. Combined toxicity of *Cassia senna* and *Citrillus colocynthis* in rats. *Vet. Hum. Toxicol.* 43 (2): 70-72.

Adom. R. O., Gachichi. J. W., Onegi. B., Tamale. J., Apio. S. O, 2003. The cardiotoxic effect of the crude ethanolic extract of *Nerium oleander* in the isolated guinea pig hearts.

African health sciences., vol. 3, pp. 77-82.

Agbor G, Ngogang J, 2005. Toxicity of herbal preparation. *Cameroon journal of ethnobotany*, vol. 1, pp 22-28.

Aguilar-Martinez, 2007. H2 – Erythrocytes- MB7 : Hématologie H2 - Faculté de Médecine Montpellier - Nîmes

Alain Damien; 2002. Guide du traitement des déchets.3 édition. Dunod. Paris

Alberti K.G., Zimmet P.J., 1998. Definition and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO Consultation. *Diabet. Med.*, 15 (7): 539-553.

Allain P, 2000. Les médicaments. Médecin Pharmacologie : 3^{ème} édition.

Allali H., Benmehdi H. , Dib M.A., Tabet B., Ghalem S., Benabadji N., 2008. Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. *Asian journal of chemistry*; 20 (04): 2701-2710.

Almahy. H. A et Khalid. H. E, 2006. Chemical examination of the leaves of *Nerium oleander* *International journal of tropical medicine.*, vol. 1, n°. 2, pp. 58-61.

Al-Yahya M. A, Al-Farhan A. H et Adam S. E. I; 2000. Preliminary toxicity study on the individual and combined effects of *citrullus colocynthis* and *Neriumoleander* in rats. *Fitoterapia*; 71: 385-391.

ANAES (l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé), 2000. Stratégie de prise en charge du patient diabétique de type 2 à l'exclusion de la prise en charge des complications. Service des Recommandations et Références Professionnelles. Paris; ISBN: 2-910653-73-0.

Azzi R, Djaziri R, Lahfa F, Sekkal F.Z, Benmehdi H, Belkacem N., 2012.

Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(10), pp. 2041-2050.

Baba Aissa F, 1999. Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algerie, Ed. Librairie moderne-Ruiba.p. 46-47-194-195-231.

Barbosa. R. R., Fontenele-neto. J. D., Soto-blanco. B, 2008. Toxicity in goats caused by oleander (*Nerium oleander*). *Research in Veterinary Science.*, vol. 85, issue 2, pp. 279-281.

Batanouny K.H., Abou Tabl S., Shabana M., Soliman F., 1999. Wild medicinal plants in Egypt: An Inventory to Support Conservation and Sustainable Use. Chapitre 2: Pharmacopoeial Wild Medicinal Plants in Egypt Academy of Scientific Research and Technology, Egypt International Union for Conservation (IUCN).

Begum. S., Sultana. R., Siddiqui. B. S, 1997. Triterpenoids from the leaves of *Nerium oleander*. *Phytochemistry.*, vol. 44, pp. 329-332.

Benmehdi H.; 2000. Valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Mémoire de magistère en chimie organique appliquée. Département de chimie faculté des sciences Université Tlemcen.

Bismuth. C, Baud. F, Conse. F, Fréjaville. P.P, Garnier. R; 1987. Toxicologie clinique. Flammarion Médecine Sciences, Paris, 956p.

Bnouham M., Mekhfi H., Legssyer A., Ziyat A., 2002. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diabetes Metab.*; 10: 33-50.

Bnouham M., Ziyat A., Mekhfi H., Tahri A., Legssyer A., 2006. Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *Int. J. Diabetes Metab.*; 14: 1-25.

Bonvalot N, 2002. Méthode d'élaboration : 14.

- Bouazza M, Henchiri C, Djahoudi A, Toubal O, 2012.** Phytochemical Screening and Antimicrobial Evaluation of the Aqueous Extracts of *Ammoides verticillata*, an Endemic Species.
- Bourgeois. B., Incagnoli. P., Hanna. J., Tirard. V, 2005.** Traitement par anticorps antidigitalique d'une Intoxication volontaire par laurier rose. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation., vol. **24**, pp. 640-642.
- Bruneton. J, 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie- Plantes médicinales-Techniques et documentations, 3ème édition, Lavoisier, pp. 463, 661-670,721-730.
- Bruneton. J, 2001.** Plantes toxiques :-végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, 2ème édition, pp.129-136.
- Buyschaert M., Hermans M.P., 1998.** Critères révisés et nouvelle classification des diabètes sucrés. Louvin Med.; 117: 1-6.
- Capet F., Debaille R., Tafforeau J., Van-Oyen H., 1999.** Situation Actuelle et Eléments pour le développement d'une Politique de Santé : diabète épidémiologie. CROSP ; 19 (1-12) : 27-28.
- Charbonnel B et Cariou B; 1997.** Diabète non insulino-dépendant : indications thérapeutiques. Médecine thérapeutique; 3. hs: 103-11.
- Clifford.J.B, Carolyn Day, 1983.** Traditionl Plant Medicines as Treatments for Diabetes. Diabetes Care, vol 12:8.
- CSST (Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec); 2004.** Notions de toxicologie. Bibliothèque nationale du Québec ; 2ème édition, ISBN.
- Darwish-Sayed M., Balbaa S.I., Afifi M.S.A., 1973.** Nitrogenous base of the different organs of *Citrullus colocynthis*. Planta Medica; 24 (3): 260-265.
- Delazar A., Gibbons S., Kosari A.R., Nazemiyeh H., Modarressi M., Nahar L., Satyajit D., 2006.** Flavone C-Glycosides and cucurbitacin Glycosides from *Citrullus colocynthis*. DARU; 14 (3): 109-114.
- Delille. L, 2007.** Les plantes médicinales d'Algérie, Berti éditions, pp. 141-142. Alger.
- Deteix, P. 2005.** <http://www.airg-france.org/textes/traitements/hypertensionarterielle-contenu.htm>.
- Diezi J, 1992.** Principe de base et répercussion clinique. In : Pharmacologie : Des Concepts fondamentaux aux application thérapeutiques, Schorderet M (Eds) Frison-Roche, Paris, Slatkine, Genève (2^{ème}Ed), pp 33-35.

Domus M, 1998. synthèse médicale, 668 : 6-22.

Drouin P., Blickle J.F., Charbonnel B., Eschwege E., Guillausseau P.J., Daninos J.M., Balarac N., Sauvanet J.P., 1999. Diagnostic et classification du diabète sucré. Les nouveaux critères. *Diabète et Métabolisme*. Paris ; 25(1) : 72-83.

Duke J.A., 1978. The quest for tolerant germplasm. In: ASA Special Symposium 32, Crop tolerance to suboptimal land conditions. Am. Soc. Agron. Madison; WI: 1-61.

Duke J.A., 1983. *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. Handbook of Energy Crops.

Duron F et Heurtier A, 2006. Epidémiologie, clinique et traitement des diabètes. *Endocrinologie*. DCEM1-Examen National Classant 2006-2007, Université Paris-VI ; 232 : 239-299.

Edelmen SV, 1998. Type II diabetes mellitus. *Adv Intern Med* ; 43 : 449-500.

Elaward A.A., Abdel Bari E.M., Mahmoud O.M., Adam S.E., 1984. The effect of *Citrullus colocynthis* on sheep. *Vet. Hum. Toxicol.*; 26: 481–485.

El Khadem H., Abdel Rahman M.M.A., 1963. Constituents of the Fruit of *Citrullus colocynthis*. *Journal of the Chemical Society*; 4: 4991-4993.

Erdemoglu. N., Kûpeli. E., Yesilada. E, 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*., vol. **89**, pp. 123-129.

Feinbrun-Dothan N, 1978. Flora Palaestina. Part III. The Israeli Academy of sciences and Humanities, Jerusalem.

Grimaldi A., 1999. Diabétologie. Questions d'internat. CHU-PS : 15-23 ; 99-129.

Grimaldi A et Timsit J,1996. Physiologie du diabète de type 1. *Imes diabètes: Comprendre pour traiter*, 4: 54-70.

Guo-Xiang Li et Zai-Qun Lui, 2007. The protective effects of ginsenosides on human erythrocytes against hemin- induced hémolysis. *Food and chemical toxicology* 466 (2008) 886-892.

Halimi S., Rostoker G., Altman J.J., Attali C. et al., 1999. Traitement médicamenteux du diabète de type 2. Agence françaises de sécurité des produits de santé. Recommandation de bonne pratique : 13-19.

Halimi S., Benhamou P.Y., 1997. Critères diagnostiques du diabète non insulino-dépendant et dépistage dans la population générale, diagnostic et traitement. In médecine thérapeutiques ; vol.3hs.

Hammouda F.M., Ismail S.I., Abdel-Azim N.S., Shams K.A., 2005. *Citrullus colocynthis* L. A Guide to Medicinal Plants in North Africa: 87-89.

Hanson. J. R, 1985. The chemistry of natural products, (R. H. Thomson ed.), chapter 4. Blackie USA: Chapman et Hall, New York, pp. 42-92.

Harborne J.B., 1998. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman & Hall Thomson Science (UK); 3^{ème} ed.: 203-234.

Hassanane M. S, El Fiky. S, Abd El Baset S. A et al; 2001. A genotoxic study of the *citrillus colocynthis* extract. Bulletin Nat Res Cen (Egypt). 26: 223-235.

Huq. M. M., Jabbar. A., Rashid. M. A., Hasan. C. M, 1999. A novel antibacterial and cardiac steroid from the roots of *Nerium oleander*. *Fitoterapia.*, vol. 70, pp. 5-9.

Hussain. M. A et Gorski. M.S, 2004. Antimicrobial activity of *Nerium oleander* Linn. Asian Journal of Plant Sciences3., vol. 2, pp. 177-180.

Ivorra M.D, Paya M, Villar A; 1989. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. *J Ethnopharmacol.* 27: 243-75.

John U., Cincinnati O., 1898. *Citrullus colocynthis*. Reprinted from the Western druggist. Chicago.

Jouad, H., 2000. Etude pharmacologique, toxicologique et phytochimique de *Spergularia purpurea* (Caryophyllacées). Doctorate Thesis .University of Sidi Med Ben Abdellah ,Faculty of Sciences Dhar Mahraz, Fez.

49. **Jouad,H.,Haloui,M.,Rhiouani,H.,ElHilaly,J.,Eddouks,M.,2001.** Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulmane). *Journal of Ethnopharmacology* 77,175–182.

Kassel D, 1996. Des hommes et des plantes. Bishen Singh, Mahendra Pal Singh, Dchra Dern...022.

Kuzuya T., Mastuda A, 2002. Classification of diabetes on the basis of etiologies versus degree of insulin deficiency. *Diabetes care* 20:219-220

Laigneau Jaques ; 2000. Mort annoncée du pire des tests.

- Larger E, 1997.** Mécanisme d'action des antidiabétiques oraux.
- La roche L. H; 2001.** Toxicologie générale : 25.
- Lev E et Amar Z; 2002.** Ethnopharmacology survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*; 82: 131-145.
- Maatooq G., El-Sharkawy S., Afifi M., Rosazza P., 1997.** C-p-Hydroxybenzoyl-glycoflavanones from *Citrullus colocynthis*. *Phytochemistry*; 44: 187-190.
- Maftah. T., Sengui. R., Djennas. A. K, 2003.** Programme UICN d'Afrique du Nord, cosmétologie au naturel, p. 11, Algérie.
- Marles R.J., Farnsworth N.R., 1996.** Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: 13-189.
- Merad Chiali R., 1973.** Contribution à la Connaissance de la Pharmacopée Traditionnelle Algérienne ; Thèse de Doctorat d'état en Pharmacie ; Institut Sciences Médicales: 101- 370.
- Merzouki A., Ed-Derfoufi F., Molero M.J., 2000.** Contribution to knowledge of Rifian traditional medicine. Folk medicine in Ksar Lakbir (NW Morocco). *Fitoterapia*; 71: 278-307.
- Montgomery C.A; 1990.** Oncological and toxicological research: Alleviation and control of pain and distress in laboratory animal's.
- Myers,1981;** In search of wild medicine. In Commonwealth p. 8-9, London, Royal Commonwealth Society.
- Najafi S., Sanadgol N., Nejad B.S., Beiragi M.A., Ehsan S., 2010.** Phytochemical screening and antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research*; 4(22): 2321-2325.
- Natiq A.R.H., Donald A.W., Nahia J.Y., 1989.** Cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. *Phytochemistry* ; 28: 1268-1271.
- Naylor C.D., Sermer M., Chen E., Farine D., 1997.** Selective screening for gestational diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*; 337 (22): 1591-1596.
- Nmila R., Gross R., Rchid H., Roye M., Manteghetti M., Petit P., Tijane M., Ribes G., Sauvaire Y., 2000.** Insulinotropic effect of *Citrullus colocynthis* fruit extracts. *Planta Med.*; 66: 418-423.
- OMS et FID (Organisation Mondiale de la Santé, Fédération Internationale du Diabète), 2004.** Communiqués de presse 2004 : il faut agir contre le diabète. Genève.

Références bibliographiques

- OMS (Organisation mondiale de la santé), 2011.** Diabète. Aide-mémoire ; N°312
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 2002.** Diabète sucré. Aide mémoire ; N°138.
- OMS (Organisation mondiale de la santé), 1999.** Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO consultation. Geneva, WHO/NCD/NCS/99.2: 1-49.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé); 2000.** Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle; 1 : 1-79.
- Orban J.C., Ichai C., 2008.** Complications métaboliques aiguës du diabète. Réanimation ; 17 : 761-767.
- Ott J.J, Italiano C, Flesch F, Tracqui A, Naibi A, Haegy J.M. 2003.** Convulsions inaugurales: évoquer l'intoxication par la Badiane du Japon. Concours Med; 127:2157-60.
- Oukal. Z, 2008.** les principales plantes toxiques chez les animaux domestiques au Maroc. (Thèse de Doctorat), Maroc.
- Paris. R.R et Moyse. H, 1971.** Précis de matière médicale, pharmacognosie spéciale dicotylédones (tome III), pp.32-52.
- Permuter G, Morin N, 2002.** Endocrinologie diabétologie et nutrition, 4^{ème} édition, Edts ESTEM, Edts MED-LINE, Paris ; 167-208
- Quezel P et Santa, 1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed.C.N.R.S.
- Rolland A, 1988.** Etude pharmacologique et contribution à l'étude botanique et chimique d'Eschscholtzia californica Cham, Doctorat de l'Université de Metz, mention pharmacognosie, p441.
- Ruckebusch Yves; 1981.** Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animales. 2e Edit.
- Saad B., Azaizeh H., Abu-Hijleh G., Said O, 2006.** Safety of traditional Arab herbal medicine. Evidence-Based Complement. Alternat. Med.; 3(4): 433-439.
- Said O., Khalil K., Fulder S., Azaizeh H., 2002.** Ethnopharmacology survey of medicinal herbs in Israel, the Golan height and the West Bank region. J. Ethnopharmacol.; 83: 251-265.
- Sawaya W.N., Dagher N.J., Khalil J.K., 1986.** *Citrullus colocynthis* seeds as a potential source of protein for food and feed. Journal-of Agricultural and Food Chemistry; 34 (2): 285-288.

Références bibliographiques

Seger C., Sturm S., Mair M., Ellmerer E., Stuppner H., 2005. ^1H and ^{13}C NMR signal assignment of cucurbitacin derivatives from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader and *Ecballium elaterium* (L.) (Cucurbitaceae). *Magn. Reson. Chem.*; 43(6): 489-91.

Société Française d'Ethnopharmacologie (S, F, E), 1993. Premier congrès intercontinental des plantes médicinales et phytothérapie, Tunis 19-20.

Siddiqui. S., Hafeez. F., Begum. S., Siddiqui. B. S, 1987. Isolation and structure of two cardiac glycosides from the leaves of *Nerium oleander*. *Phytochemistry.*, vol. **26**, pp. 237-241.

Sijelmassi A, 1991. Essential oil and aromatic carminatives martinal.

Simon D et Eschwege E ; 2005. Données épidémiologiques sur le diabète de type 2. *BEH* : 20-21 et 86-87.

Shubik P, Sicé J; 1956. Chemical carcinogenesis as a chronic toxicity test. *Cancer Res.*, 16, 728.

Trease G.E., Evans W.C., 1989. A textbook of Pharmacognosy (13th edition) Bacilluere Tinal Ltd, London.

Trevoux R., Arnal-Schnebelen B., Schnebelen J., 2000. Interactions médicamenteuses Interactions entre les plantes médicinales et la médication traditionnelle. *Actualités reproduction humaine* ; VIII (1) : 28-32.

Truhaut R; 1956. Les risques d'action cancérogènes des substances étrangères ajoutées en vue d'améliorer les qualités organoleptiques des aliments. *Ann. Falsif. (Paris)*. 49, 107, 136.

Viala A., Botta A., 2007, Toxicologie, Lavoisier, 2^{ème} Ed. : 03.

Virally M, Blicklé J F, Girard J, Halimi S, Simon D, Guillausseau P J ; 2008 diabete de type 2 : épidémiologie, physiopathologie, problème non résolu et respectives thérapeutiques, la revue de médecine interne 29(11) :88-890

Wens J,Sunaert P, nobels F, Feyen L, Crombruggen PV, Bastiaens H ,Royen PV ;2007. diabete sucré type 2 recommandation de bonne pratique .sociétés scientifique de médecine générale.

Whiting D.R., Guariguata L., Weil C., Shaw J., 2011. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* ; 94: 311-321.

Références bibliographiques

Wolffenbittel B et Van Haeften T, 1995. Prevention of complication in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Drugs*, 50 : 263-288.

Yaniv Z., Ellashabelsky, Schafferman D., 1999. Colocynth : Potential arid land oil seed from an ancient cucurbit. *in*: J. Janick (Ed). Perspectives on new crops and new use. ASHS press; Alexandria VA.

Yoshikawa M., Morikawa T., Kobayashi H., Nakamura A., Matsuhira K., Nakamura S., Matsuda H., 2007. Structures of new cucurbitan-type triterpene glycosides and antiallergic constituents from *Citrullus colocynthis*. *Chem. and pharmaceutical bulletin*; 55(3): 428-434.

Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli, Serhrouchni M et Benjelloun W ; 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*; 58: 45-54.

Zoro A.B.I., Koffi K.K., Djè Y., 2003. Caractérisation botanique et agronomique de trois espèces de cucurbites consommées en sauce en Afrique de l'Ouest : *Citrullus* sp., *Cucumeropsis mannii* Naudin et *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*; 7 (3-4): 189-199.

Annex

Préparation des réactifs pour tests Phytochimiques

Réactif de Dragendorff

(Tétraiodobismuthate de potassium) ou appelle aussi réactif à l'iodobismuthate de potassium

- ❖ **Solution A** : Dissolve 0.5g de bismuth nitrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) dans 20 ml d'acide acétique 20% ;
- ❖ **Solution B** : 5ml de KI préparée à 40% dans l'eau distillé ;
- ❖ Mélanger A et B et Ajuster à 100ml par l'eau distillé.

Réactif de Mayer

- ❖ **Solution A** : 1.358g de chlorure de mercure HgCl_2 sont dissous dans 60 ml d'eau distillée ;
- ❖ **Solution B** : 5g d'iodure de potassium KI sont dissous dans 10ml d'eau distillée ;
- ❖ Les solutions A et B sont mélangées extemporarement et le volume final est ajusté à 100ml avec d'eau distillée.

Réactif de Wagner

- ❖ 2g de KI et 1,27g de I sont dissous dans 75ml d'eau distillée, puis ajustés à 100ml avec d'eau distillée.

Liqueur de Fehling

- ❖ **Solution A** : solution de sulfate de cuivre à 40 g/l ;
- ❖ **Solution B** : 200 g de tartrate de potassium-sodium et 150 de NaOH pour 1 litre d'eau distillée ;
- ❖ Mélanger les deux solutions à volumes égaux (à mélanger juste avant l'emploi).

Nerium oleander

| | 0 | 15 | 30 | 45 |
|---------|---|--------|--------|--------|
| témoin | 0 | 0,0054 | 0,0186 | 0,0258 |
| 5mg/ml | 0 | 0,0476 | 0,0638 | 0,0637 |
| 10mg/ml | 0 | 0,0748 | 0,0791 | 0,0896 |
| 15mg/ml | 0 | 0,0870 | 0,0908 | 0,0988 |
| 20mg/ml | 0 | 0,0922 | 0,1216 | 0,1491 |

citrullus colocynthis

| | 0 | 15 | 30 | 45 |
|---------|---|--------|--------|--------|
| témoin | 0 | 0,0054 | 0,0186 | 0,0258 |
| 5mg/ml | 0 | 0,0733 | 0,0794 | 0,0817 |
| 10mg/ml | 0 | 0,0798 | 0,0801 | 0,1215 |
| 15mg/ml | 0 | 0,0847 | 0,1024 | 0,2009 |
| 20mg/ml | 0 | 0,1008 | 0,1205 | 0,3021 |

Ammiodes verticillata

| | 0 | 15 | 30 | 45 |
|---------|---|--------|--------|--------|
| témoin | 0 | 0,0054 | 0,0168 | 0,0258 |
| 5mg/ml | 0 | 0,0013 | 0,0248 | 0,0394 |
| 10mg/ml | 0 | 0,0262 | 0,0315 | 0,0403 |
| 15mg/ml | 0 | 0,0301 | 0,0345 | 0,0438 |
| 20mg/ml | 0 | 0,0353 | 0,0357 | 0,0537 |

Nerium oleander

| Temps (min) | Taux d'hémolyse (%) | | | |
|-------------|---------------------|------|------|------|
| | 0 | 15 | 30 | 45 |
| 5mg/ml | 0 | 3,73 | 3.89 | 3.02 |
| 10mg/ml | 0 | 6,13 | 5.21 | 5.09 |
| 15mg/ml | 0 | 7.21 | 6.21 | 5.82 |
| 20mg/ml | 0 | 7.67 | 9.18 | 9.84 |

citrullus colocynthis

| Temps (min) | Taux d'hémolyse (%) | | | |
|-------------|---------------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 15 | 30 | 45 |
| 5mg/ml | 0 | 8.42 | 6.16 | 5.53 |
| 10mg/ml | 0 | 9.22 | 6.23 | 9.21 |
| 15mg/ml | 0 | 9.83 | 8.49 | 16.86 |
| 20mg/ml | 0 | 11.83 | 10.33 | 26.61 |

Ammoides verticillata

| Temps (min) | Taux d'hémolyse (%) | | | |
|-------------|---------------------|-------|------|------|
| | 0 | 15 | 30 | 45 |
| 5mg/ml | 0 | -0.48 | 0,69 | 1.45 |
| 10mg/ml | 0 | 2.46 | 1.43 | 1.54 |
| 15mg/ml | 0 | 2.92 | 1.77 | 1.92 |
| 20mg/ml | 0 | 3.54 | 1.90 | 2.98 |