

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen-
Faculté des sciences de la nature et de la vie, de la terre et l'Univers
Département de Biologie



Master - 59/03

Inscrit Sous le N°:	4670
Date:	
Cote:	16-5-10

Laboratoire de recherche

« Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique »

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie,

Option « Biochimie Appliquée »

Thème

**Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et
inhibitrice de l' α -amylase des proanthocyanidines
extraites de l'épicarpe de *Punica granatum* L.
(grenadier).**

Présenté par :

M^{elle} BACHIRI Asma



Soutenu le 13 juillet 2010 devant le jury :

M ^{elle} BENARIBA N.	Chargé de cours	Présidente	Université de Tlemcen
Mr AZZI R.	Chargé de cours	Examineur	Université de Tlemcen
Mr DJAZIRI R.	Maître de conférences	Promoteur	Université de Tlemcen

Année Universitaire 2009-2010

Remerciements

On remercie tout d'abord Dieu tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.

Nous tenons à remercier

En premier lieu, notre encadreur M^r DJAZIRI R, Maître de conférences au département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen-, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses encouragements et ses conseils judicieux tout le long de la réalisation de ce mémoire. Qu'il trouve ici le témoignage de nos profondes reconnaissances.

Nos remerciements à Melle BENARIBA N., Chargé de cours au département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen- pour avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions également Monsieur AZZI R. Maître assistant au département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen- pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous exprimons une profonde gratitude et nos remerciements à M^{elle} BELKACEM Nacéra Doctorant en Biochimie pour l'aide et pour ses conseils au cours de la réalisation de ce travail. Qu'elle trouve ici le témoignage de nos profonds respects.

Nous adressons aussi nos sincères remerciements à M^r Rahmoun M.N. Ingénieur de laboratoire où le travail a été réalisé, pour sa présence et son aide précieuse.

Nous tenons à remercier profondément le personnel du laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » en particulier M^{me} BOUCHERIT Z., Maître de conférences au département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen-, et Directrice du laboratoire de recherche.

Tous les enseignants du département de Biologie et les étudiants de la promotion SNV LMD
2009/2010

Et tous ceux qui ont participés de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.



A mes parents

A mes sœurs et mon frère

A mon fiancé

A mes amies Amel, Asma, Assia, Fatima, Houria, Karima, Najet , Nesrine, Sihem ,Wassila, Yakout , zineb .

A Souhila, Zineb, Ahlem, Nacera, Ismahène.

A Nacer et Hassini.



LISTE DES FIGURES

Figure 01 : <i>Punica granatum</i>	11
Figure 02 : structure des tannins condensés et leur monomère.....	14
Figure 03 : Structure des tanins hydrolysables et les acides associés.....	14
Figure 04 : Protocol d'extraction des proanthocyanidines.....	17
Figure 05 : Courbe étalon de l'acide gallique ($\lambda=700$ nm).....	25
Figure 06 : Pouvoir antioxydant des proanthocyanidines de l'épicarpe de <i>P. granatum</i>	26
Figure 07 : Evolution de la glycémie durant 3h chez des rats normaux soumis à une HGPO (saccharose à 4 g/kg) et traités par les proanthocyanidines de l'épicarpe de <i>P. granatum</i> par voie orale (400 mg/kg).....	27
Figure 08 : Evolution de la glycémie durant 3h chez des rats normaux soumis à une HGPO (Amidon à 5 g/kg) et traités par les proanthocyanidines de l'épicarpe de <i>P. granatum</i> par voie orale (400mg/kg).....	28
Figure 09 : Courbe d'étalonnage du maltose ($\lambda=540$ nm).....	29
Figure 10 : Effet de différentes concentrations d'amidon en fonction du temps sur l'activité de l' α -amylase (AE=1.3 UI/ml).....	30
Figure 11 : Représentation de <i>Lineweaver et Burk</i> de la réaction enzymatique à différentes concentrations de substrat.....	31
Figure 12 : Quantités du maltose (mM) produites en fonction du temps après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence des proanthocyanidines de <i>P. granatum</i> à 0.5 g/L.....	32
Figure 13 : Quantités du maltose (mM) produites en fonction du temps après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence des proanthocyanidines de <i>P. granatum</i> à 1 g/L	32
Figure 14 : Quantités du maltose (mM) produites en fonction du temps après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence des proanthocyanidines de <i>P. granatum</i> à 1.5 g/L	32
Figure 15 : Quantités du maltose (mM) produites en fonction du temps après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence des proanthocyanidines de <i>P. granatum</i> à 2 g/L	32
Figure 16 : Représentation de <i>Lineweaver Burk</i> en absence et en présence des proanthocyanidines de <i>P. granatum</i> , (AE=1.3 UI/mL).....	34
Figure 17 : Courbe logarithmique des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des proanthocyanidines de <i>P. granatum</i>	35
Figure 18 : Représentation de Dixon : $1/V_i=f [I]$	35

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Critères de diagnostic du diabète sucré et des troubles de la glycorégulation.....	03
Tableau 02 : Complications du diabète.....	05
Tableau 03 : Quelques activités biologiques de <i>Punica granatum</i> citées dans la littérature scientifique	12
Tableau 04 : Composition de l'aliment « EL ALF » en pourcentage.....	20
Tableau 05 : Répartition des rats normaux soumis a un test d'HGPO.....	20
Tableau 06 : Gamme d'étalonnage du maltose.....	21
Tableau 07 : Variation de la glycémie chez les rats soumis à une HGPO (saccharose à 4 g/kg) et traités par les proanthocyanidines de l'épicarpe de <i>P. granatum</i> par voie orale.....	26
Tableau 08 : Variation de la glycémie chez les rats soumis à une HGPO (Amidon 5 g/kg) et traités par les proanthocyanidines de l'épicarpe de <i>P. granatum</i> par voie orale.....	28
Tableau 09 : Les vitesses initiales de la réaction enzymatique à différentes concentrations de substrat....	30
Tableau 10 : Les vitesses initiales exprimées en mM/min obtenues après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en absence et en présence de différentes concentrations des proanthocyanidines (AE=1.3 UI/ml).....	33
Tableau 11 : Les vitesses maximales et les constantes de Michaelis obtenues en absence et en présence des proanthocyanidines.....	34
Tableau 12 : Les pourcentages d'inhibition des proanthocyanidines calculés à une concentration de substrat de 3 g/L (AE=1.3 UI/ml).....	35

SOMMAIRE

Introduction générale	1
1. Définition de diabète sucré.....	3
2. Critères de diagnostic.....	3
3. Classification du diabète.....	4
4. Complications du diabète.....	5
5. Diabète et stress oxydatif.....	6
6. Traitement du diabète sucré.....	7
7. Utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète.....	10
8. <i>Punica granatum</i>	10
9. Les tanins.....	13
Matériel et Méthodes	
1. Matériel végétal.....	16
1.1. Récolte et préparation.....	16
1.2. Extraction des proanthocyanidines.....	16
1.3. Dosage des polyphénols.....	18
2. Étude de l'activité antioxydante des proanthocyanidines par la méthode de <i>FRAP</i>	19
3. Influence des proanthocyanidines sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale <i>in vivo</i>	19
3.1. Les animaux.....	19
3.2. Effet des proanthocyanidines sur l'HGPO.....	20
4. Effet des proanthocyanidines sur l'activité de l' α -amylase <i>in vitro</i>	20
4.1. Matériels.....	20
4.2. Méthodes.....	22
5. Analyses statistiques.....	23
Résultats et interprétation	
1. Rendement de l'extraction.....	25
2. Dosage des polyphénols.....	25
3. Activité antioxydante des proanthocyanidines par la méthode de <i>FRAP</i>	25
4. Influence des proanthocyanidines sur L'HGPO.....	26
5. Effet des proanthocyanidines sur l'activité de l' α -amylase <i>in vitro</i>	29
5.1. Courbe d'étalonnage.....	29
5.2. Cinétique enzymatique de l' α -amylase en absence d'inhibiteur.....	30
5.2.1. Mesure des vitesses initiales.....	30
5.2.2. Détermination des paramètres cinétiques de l' α -amylase.....	31
5.3. Cinétique enzymatique en présence des proanthocyanidines de <i>P. grantaum</i>	31
5.3.1. Mesure des vitesses initiales en présence des proanthocyanidines.....	33
5.3.2. Détermination du mécanisme d'inhibition.....	33
5.3.3. Détermination des pourcentages d'inhibition et l' IC_{50}	34
5.3.4. Détermination de la constante d'inhibition (K_i).....	35
Discussion	36
Conclusion et perspectives	40
Références Bibliographiques	41

Introduction générale

Le diabète sucré est un grave problème de santé publique qui gagne rapidement du terrain. Aujourd'hui, il est l'une des principales maladies non transmissibles dont la fréquence augmente à une vitesse alarmante partout dans le monde, dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement.

Le nombre total de cas de diabète, estimé actuellement à 194 millions ; peut atteindre plus de 330 millions en 2025. Dans la majorité des cas, au moins 90 %, il s'agit d'un diabète de type 2, qui se manifeste sous forme de véritable « épidémie silencieuse » ; a de graves conséquences en termes de morbidité, de mortalité et de prise en charge médicale très coûteuse. D'après des nouvelles estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS) et la fédération internationale du diabète (FID) en 2004, le diabète serait à l'origine de plus de 3.2 millions de décès chaque année dans le moindre (OMS et FID, 2004).

Il est défini par l'élévation chronique de la glycémie qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou que l'organisme ne peut utiliser de manière efficace l'insuline qui est produite (Rodier, 2001).

La gravité du diabète reste liée à ses complications, à savoir les atteintes cardiovasculaires, les accidents vasculaires cérébraux, l'insuffisance rénale, la cécité, les gangrènes des pieds à l'origine des amputations et l'impuissance sexuelle (OMS, 2007).

La corrélation entre hyperglycémie et stress oxydatif est bien connue dans le domaine de complications secondaires du diabète (Baynes, 1992). Au cours du diabète, le stress oxydatif joue un rôle majeur dans l'apparition des complications. De ce fait, les patients diabétiques présentent un déséquilibre entre les espèces réactives de l'oxygène et les défenses antioxydantes, au profit des premiers (Roucky, 2001), pour contrôler ce déséquilibre, notre organisme dispose de moyens de protection enzymatiques et non enzymatiques (Joël *et al.*, 2001).

Les traitements de cette affection consistent, à contrôler le niveau glycémique des malades par des mesures diététique, des antidiabétiques oraux ou par l'insulinothérapie pour les diabétiques de type 2, et par l'insulinothérapie dans le cas des diabétiques de type 1 (Charbonnel et Cariou, 1997).

L'impact de cette pathologie sur les systèmes de santé est très lourd, Les médicaments antidiabétiques disponibles visent à soigner et non à guérir la maladie.

Au cours de ces dernières décennies, une attention particulière a ciblé l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement et le contrôle de cette maladie conformément aux recommandations de l'OMS (OMS, 2002b).

Ainsi, une grande partie de la population diabétique, en Algérie comme dans les autres pays en voie de développement et même dans les pays développés, se tournent de plus en plus vers les traitements traditionnels à base des plantes.

Plusieurs études ethnopharmacologies, ont été réalisées dans la région du Maghreb, dont la population est reconnu par l'usage de plantes médicinales, montrent la diversité des plantes médicinales utilisées pour le traitement du diabète comme la *Citrullus colocynthis*, *Berberis vulgaris*, *Punica granatum*, ... (Ziyyat *et al.*, 1997 ; Jouad *et al.*, 2001 ; Bnouham *et al.*, 2002).

Dans la région de Tlemcen, et d'après l'enquête ethnobotanique réalisée par Benmehdi en 2000, plus de 80 espèces des plantes sont utilisées en médecine populaire pour le traitement du diabète sucré ou ses symptômes dont *Punica granatum* (grenadier) est l'une de ces plantes (Benmehdi, 2000).

Notre travail s'inscrit dans le cadre général de recherche des propriétés antidiabétiques de cette plante (*P.granatum*) qui est utilisées traditionnellement dans notre région.

Une des approches thérapeutiques du diabète sucré est de diminuer l'hyperglycémie postprandiale par le ralentissement de l'absorption intestinale de glucose. Cet effet est assuré par l'inhibition des enzymes responsables de l'hydrolyse des hydrates de carbones comme l' α -glucosidase et l' α -amylase (Rhabasa et Chiasson, 2004 ; Kim *et al.*, 2004).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'un des principaux constituants de cette plante qui sont les tanins et particulièrement les prpanthocyanidines. Cette étude consiste à :

- * Evaluer le pouvoir réducteur des proanthocyanidines ;
- * Evaluer l'effet de ces composés sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale chez les rats normaux ;
- * Ainsi que l'effet inhibiteur vis-à-vis de l' α -amylase, enzyme responsable de l'hydrolyse de certains polysaccharides.



Synthèse bibliographique

1. Définition de diabète sucré

Le diabète sucré est une affection du métabolisme caractérisée par une augmentation du taux de glucose sanguin « hyperglycémie » qui perturbe le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Cette affection est due à une défaillance de la sécrétion d'insuline, de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (Wens *et al.*, 2007 ; Ortiz-Andrade *et al.*, 2005) ; (Moore *et al.*, 2004).

Cette affection touche environ 5 à 7% de la population mondiale dont 90% sont des diabétiques de type 2 (Zimmet *et al.*, 2001 ; Waeber, 2000 ; Barcelo, 1996).

2. Critères de diagnostic

De nouveaux critères de diagnostic du diabète sucré ont été proposés par l'*American Diabetes Association* « ADA » qui propose pour la pratique clinique, de déterminer la glycémie à jeun sur du plasma veineux (ADA, 2005).

Selon ces critères, le diabète sucré est défini par une glycémie plasmatique à jeun de 1.26 g/l ou >2 g/l quelque soit l'heure du prélèvement en présence de symptômes cliniques (polyurie, polydipsie, amaigrissement, somnolence voire coma).

Ce diagnostic peut également être posé devant une valeur de 2 g/l à la 120^{ème} minute d'une épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale « HGPO » (Rodier, 2001) ; (Drouin *et al.*, 1999).

Une glycémie à jeun modérément augmentée (1.1 g/l mais <1.26 g/l) correspond à une glycémie à jeun anormale (Impaired Fasting Glycemia) ; état qui induit un trouble de l'homéostasie glucidique. Cette catégorie est grosso modo équivalente à la classique intolérance au glucose définie par une glycémie de 1.4 g/l mais < 2 g/l à la 120^{ème} minute de l'HGPO (Wens *et al.*, 2007 ; Rodier, 2001) (Tabl. 01).

Tableau 01 : Critères de diagnostic du diabète sucré et des troubles de la glycorégulation.

(Alberti et Zimmet, 1998)

Concentration de glucose	g/L	mmol/L
Diabète sucré		
• A jeun	≥1.26	7.0
Ou		
• 2h après charge en glucose ou les deux	≥2.00	11.1
Intolérance au glucose		
• A jeun	<1.26	7.0
Et		
• 2h après charge en glucose	≥1.40	7.8
Hyperglycémie modérée à jeun		
• A jeun	≥1.10	6.1
Et		
• 2h après charge en glucose (si mesurée)	<1.40	7.8

3. Classification de diabète

Une nouvelle classification du diabète a été proposée par l'ADA (American Diabetes Association) en 1997.

Cette classification différencie quatre grands types de diabète :

- Le diabète de type 1 (anciennement insulino-dépendant) ;
- Le diabète de type 2 (anciennement non insulino-dépendant) ;
- les autres types de diabètes spécifiques ;
- Le diabète gestationnel (**The expert Committee, 1997**).

➤ Diabète de type 1

C'est une maladie auto-immune, caractérisé par une destruction des cellules B des îlots de Langerhans du pancréas. Cette destruction est provoquée par plusieurs agents de l'environnement sur un terrain génétiquement prédisposé. Dans ce cas, l'insulinothérapie est indispensable (**Sepa et al., 2005 ; Filippi et Von Herrath, 2005 ; Rutten et al., 2006**).

➤ Diabète de type 2

Il représente 90 % de l'ensemble des diabètes, il survient le plus souvent chez l'adulte, mais on l'observe aussi chez les adolescents (**OMS, 2002a**).

C'est le diabète non insulino-dépendant qui pose un problème de santé publique. Sa prévalence augmente parallèlement au vieillissement, à l'urbanisation, à la sédentarisation et au développement de l'obésité (**Grimaldi, 1999**).

Il est caractérisé par :

- Une insulino-résistance dominante; et/ou
- Une diminution prédominante de l'insulinosécrétion associée ou non à une insulino-résistance (**Drouin et al., 1999 ; Girard, 1999**).

Le diabète de type 2 est la forme la plus commune du diabète sucré. L'étiologie spécifique de cette maladie est inconnue (**OMS, 1999**).

Plusieurs facteurs favorisent le déclenchement du diabète de type 2 :

- La prédisposition familiale probablement d'origine génétique ;
- Facteurs environnementaux tel que l'obésité qui joue un rôle dans la genèse de l'insulino-résistance, la nature alimentaire, l'âge, les médicaments, le stress, la sédentarité (**Drouin et al., 1999**).

4. Les complications du diabète

Le diabète sucré s'accompagne de complications métaboliques aiguës, dont les plus fréquentes sont l'acidocétose et le coma hyperosmolaire et d'autres chroniques: la microangiopathie qui intéresse les petits vaisseaux, elle se manifeste au niveau de l'œil (rétinopathie), des reins (néphropathie) et les nerfs (neuropathie) (Grimaldi, 1995).

La macroangiopathie, qui désigne l'atteinte des artères et qui regroupe les maladies de la paroi artérielle et l'artériosclérose. Les complications non traitées conduisent à un taux de mortalité élevée (OMS, 2006), sa chronicité et ces complications graves nécessitent une prise en charge médicale, qui est parfois coûteuse pour les diabétiques, et qui repose essentiellement sur l'insulinothérapie et/ou les antidiabétiques oraux (sulfamides, biguanidines et les inhibiteurs de l' α -glucosidases).

Tableau 02: Complications du diabète (Capet *et al.*, 1999).

Complications aiguës	Hypoglycémie (suite au traitement) Hyperglycémie	Acidocétose Coma hyperosmolaire Acidose lactique
Complications chroniques	Microvasculaires (Microangiopathie) Macrovasculaires (Macroangiopathie)	Rétinopathie Néphropathie Neuropathie Cardiovasculaires

5. Diabète et stress oxydatif

5.1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydant peut être défini comme le résultat de la rupture de l'équilibre entre la production d'espèces moléculaires hautement réactives, principalement l'oxygène (Reactive Oxygen Species ROS) et l'azote (Reactive Nitrogen Species RNS) et les mécanismes de défense antioxydante (Robertson, 2004).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant un ou plusieurs électrons non appariés. De ce fait, ils sont très instables et réagissent avec des molécules voisines en leur arrachant un électron et les transformant à leur tour en espèces radicalaires plus réactives (Leverve, 2004).

Ces espèces chimiques ont un rôle physiologique important en agissant à faible concentration comme des messagers secondaires capables :

- ✓ de réguler le phénomène d'apoptose qui est un suicide programmé des cellules évoluant vers un état cancéreux (Curtin *et al.*, 2002).
- ✓ d'activer des facteurs de transcription, eux mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (Owuor et Kong, 2002).
- ✓ de moduler l'expression de gènes de structure codant pour les enzymes antioxydantes (Holgrem, 2003).

L'excès de production de radicaux libres, entraîne des conséquences cytotoxiques et des lésions tissulaires par dégradation des protéines, altération de l'ADN, des glucides et surtout des lipides constitutifs des membranes.

5.2. Relation entre stress oxydatif et diabète

De nombreux travaux rapportent une augmentation du stress oxydatif au cours du diabète, à la diminution des activités des enzymes antioxydantes, et des taux des vitamines antioxydantes (Furukawa *et al.*, 2004 ; Morrow, 2003). Celui-ci est la conséquence de concentrations anormalement élevées de glucose (Nicholson *et al.*, 2002).

Les radicaux libres interviennent chez l'homme dans l'apparition des troubles de la sécrétion d'insuline et de la sensibilité à l'insuline qui caractérisent le diabète de type 2, d'une part les cellules bêta sont très sensibles au stress oxydatif, d'autre part de nombreuses données expérimentales indiquent que ce dernier pourrait représenter un mécanisme par lequel l'hyperglycémie chronique aggrave la fonction insulinosécrétoire dans le diabète de type 2 (Morrow, 2003).

Le stress oxydant est de plus en plus suspecté d'être à l'origine à la fois d'une réduction de la sécrétion d'insuline par les cellules des îlots de Langerhans et d'une diminution de l'action de cette hormone hypoglycémisante aggravant l'état d'insulinorésistance dans le diabète de type 2 (Evans *et al.*, 2003).

Plusieurs études sur des lignées cellulaires *in vitro* démontrent que le stress oxydatif inhibe la transduction du signal de l'insuline. En inhibant l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline (Hansen *et al.*, 1999). Il inhibe également la translocation du transporteur de glucose GLUT4 et l'activation de la protéine kinase B stimulées par l'insuline dans les cellules adipeuses. Ces effets sont bloqués en présence d'un antioxydant (Rudich *et al.*, 1999).

6. Traitement du diabète sucré

6.1. 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 situation, les objectifs thérapeutiques consistent à apporter l'insuline endogène qui fait défaut (**Gin et Rigalleau, 1999**).

La prise en charge diététique et nutritionnelle de ces patients consiste donc à standardiser avec eux, le plus possible, les quantités de glucides qui seront apportées à chacun des repas, pour alors ne faire varier que les quantités d'insuline qui seront mise en adéquation avec l'activité physique (**Ledoux, 1997**).

6.2. Traitement du diabète de type 2

a. La diététique

Il est indispensable de promouvoir la prise en charge non médicamenteuse du diabète. Les difficultés évidentes de cette prise en charge demandent des efforts constants de la part du patient comme de son médecin. L'activité physique et la planification alimentaire, le "régime", sont des mots que l'on devrait écrire en premier sur l'ordonnance à chaque fois que l'on en rédige une.

b. L'activité physique

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**).

L'activité physique doit être adaptée dans son type, sa quantité et son intensité. Harmonieusement répartis, les efforts se transforment rapidement en plaisir et doivent s'inscrire dans la durée (**Monnier et Avignon, 1997**). Cette activité physique est justifiée par :

- ❖ Une augmentation de l'utilisation musculaire et de la sensibilité tissulaire à l'insuline (**Tournaire et al., 1994**);

- ❖ Une perte de poids ou un maintien d'une masse maigre stable (**Charbonnel et Cariou, 1997**);

- ❖ Les activités d'endurance ont une action bénéfique sur l'ensemble des paramètres du syndrome d'insulino-résistance en particulier ses conséquences cardio-vasculaires (hypertension artérielle) et métaboliques (**Duron et Heurtier, 2006**).

c. Le régime alimentaire

Il est indispensable quelle que soit la variété du diabète. Il doit obéir à plusieurs principes

- * Apporter la ration calorique nécessaire ;
- * Equilibrer les apports, sucre, lipide et protéine ;
- * Réduire dans la mesure le plus possible, l'hyperglycémie et la glycosurie (**Domart et Bourneuf, 1986**).

Les besoins énergétiques dépendent de la taille, du sexe, l'âge, du climat, la situation physiologique et surtout du niveau d'activité physique.

Contrairement à une idée très répandue, le diabétique ne doit pas supprimer les sucres dans son alimentation. Il est indispensable d'assurer un apport minimal du glucide capable de couvrir les besoins de l'organisme (**Domart et Bourneuf, 1986**). Il est nécessaire de fournir un minimum de 140 g de glucides par jour (**Monnier et al., 1995**).

La ration glucidique peut être comprise entre 45 à 50%, en favorisant les glucides complexe a digestion et absorption lentes et indice glycémique faibles (le pouvoir hyperglycémique), comme riz, pâtes, pain, légumes secs etc., en réduisant les glucides simples à absorption rapides et à indice glycémique élève comme (sucre, fruit, confiture, miel, crème, etc.) (**Gin et Rigalleau, 1999**).

d. Les antidiabétiques oraux

Le traitement antidiabétique oral s'articule actuellement autour de 4 classes thérapeutiques dirigées vers trois cibles physiopathologiques différentes :

- ❖ Une stimulation de l'insulinosécrétion par les sulfamides hypoglycémiantes (S.H) ;
- ❖ Une diminution de l'insulinorésistance par les biguanides et les thiazolidinediones ;
- ❖ Un ralentissement de l'absorption intestinale du glucose par les Inhibiteurs Alpha Glucosidases (**Charbonnel et Cariou, 1997**).

➤ Les sulfamides hypoglycémiantes

Ils possèdent des effets pancréatiques, ils stimulent la sécrétion d'insuline et potentialisent l'effet insulinosécrétoire du glucose; ces sulfamides hypoglycémiantes se lient à un récepteur spécifique situé sur la membrane de la cellule β pancréatique. La liaison des sulfamides au récepteur entraîne la fermeture des canaux potassique ATP-dépendants de la cellule, la membrane se dépolarise et les canaux calciques s'ouvrent secondairement. L'afflux de calcium dans le cytoplasme des cellules β induit l'exocytose des vésicules contenant l'insuline d'une façon similaire à celle observée après stimulation par le glucose (**Larger, 1998**).

➤ Les biguanides

Concernant les biguanides leur unique représentant est la metformine (Anaes, 2000), contrairement aux sulfamides, les biguanides n'ont aucune action insulinosécrétrice, mais elles ont un mode d'action exclusivement extra pancréatique surtout dans le foie, muscle et tissu adipeux (Larger, 1997); La metformine améliore la sensibilité des tissus cibles à l'insuline endogène ou exogène; diminue de 9 à 30% la production hépatique du glucose en agissant principalement sur la voie de la néoglucogenèse; elle stimule la glycolyse anaérobie dans le muscle, elle augmente la captation du glucose dans le tissu adipeux, avec diminution du taux de triglycéride et du cholestérol; et ralentissement de l'absorption intestinale du glucose (Larger, 1997 ; Dunn et Peters, 1995).

➤ Les inhibiteurs de l' α -glucosidases

Les inhibiteurs de l' α -glucosidases sont essentiellement représentés par l'Acarbose, qui est un pseudo-tétracaccharides, isolé en 1970 à partir d'une bactérie (Actinoplanacea) *Actinoplanes utahensis* dont l'homologie structurale avec les tétracaccharides de l'alimentation explique la liaison aux α glucosidases de la bordure en brosse des entérocytes. Leur efficacité tient à la très forte affinité de cette liaison, il s'agit d'une liaison rapidement réversible et compétitive avec le site d'action de l'enzyme (Larger, 1997).

Ils inhibent le dernier stade de la digestion des sucres. Ceux qui ne peuvent être absorbés; continuent leur périple dans l'intestin et subissent la fermentation alcoolique bactérienne en acides gras volatiles où sont éliminés dans les selles (Grimaldi, 1999 ; Duron et Heurtier, 2006).

e. L'insulinothérapie

Si environ 70 % des diabétiques de type 2 sont initialement correctement contrôlés par un traitement antidiabétique oral, entre 5 à 10 % échappent au traitement oral chaque année (Kreider *et al.*, 1997).

La mise en route d'une insulinothérapie ne transforme pas un diabétique de type 2 en diabétique de type 1. Il est proposé comme un traitement transitoire qui permet pendant quelques semaines (15 à 30 jours) d'obtenir un bon profil glycémique et de supprimer la glucotoxicité (De-Broucker, 1986).

Les mises à l'insuline se font dans un contexte d'urgence immédiate ou à très court terme. Ces situations aiguës conduisent à une insulinothérapie dont la nécessité doit être réévaluée après l'épisode aiguë (Brun *et al.*, 1995).

Toutes ces différentes classes thérapeutiques peuvent présenter des effets secondaires chez la population des diabétiques, l'échec des traitements pharmaceutiques conventionnels, la forte incidence des effets indésirables qui leur sont associés et l'insuffisance d'infrastructure sanitaires dans les pays en voie de développement font qu'une large tranche de la population mondiale dépend essentiellement de la médecine naturelle, complémentaire ou parallèle pour se soigner (Eddouks, 2007).

7. Utilisation de plante médicinale dans le traitement du diabète

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (Decaux, 2002).

Plus de 1200 espèces de plantes recensées par les ethnopharmacologues, sont expérimentées contre le diabète de type 2. Ces plantes représentent 725 genres et 183 familles. 81% de ces plantes testées sur les animaux de laboratoire montrent une réduction de l'hyperglycémie (Marles et Farnsworth, 1996).

Bnouham *et al.* (2006), ont regroupé l'ensemble des plantes antidiabétiques étudiées et reportées dans la littérature entre 1990 et 2000. Ils ont recensé 176 espèces de plantes intégrées dans 84 familles à pouvoir antidiabétique claire. Elles sont présentées par leurs noms scientifiques, la famille, modes d'utilisations, le degré du pouvoir hypoglycémiant et l'agent actif. Ils ont constaté que les familles des plantes les plus étudiées (qu'ont confirmé leurs pouvoirs hypoglycémiant, soit en corrigeant les anomalies métaboliques ou en retardant les complications du diabète) sont par exemple : la famille des Leguminosae (11 espèces : sp), Lamiaceae (7 sp), Liliaceae (8 sp). Et les espèces les plus étudiées sont : *Citrullus colocynthis* L. (Cucurbitaceae), *Opuntia streptacantha* Lem. (Cactaceae) (Bnouham *et al.*, 2006).

Dans la région de Tlemcen, les informations ethnobotaniques recueillies par Benmehdi en 2000 confirment l'importante dépendance de la population locale vis-à-vis des plantes médicinales pour traiter le diabète.

Plus de 80 espèces de plantes médicinales ont été répertoriées dans cette région et sont utilisées seules ou en combinaison avec les médicaments de synthèse (Benmehdi, 2000).

8. *Punica granatum*

a. Description botanique

C'est un petit arbuste des régions méditerranéennes qui peut atteindre 6 m de haut. Il peut vivre jusqu'à 200 ans mais est le plus productif en fruits dans ses 20 premières années de

fructification ; Son écorce est gris beige et à tendance à se crevasser et à desquamer avec l'âge.

Ses feuilles caduques sont opposées, luisantes et mesurent 3 à 7 cm de long sur 2 cm de large, Ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre. Ses fruits, les grenades, contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses. Cultivé partout et souvent sub spontané dans le tell. La floraison a lieu en fin d'été. Fructification en Septembre et Octobre (Bridel *et al.*, 2004 ; Quezel et Santa, 1963) (Fig. 01).



Figure 01 : *Punica granatum* (Wikipédia, 2010)

b. Classification botanique

Règne : Végétale

Embranchement : Phanérophytes

Sous Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotyledones

Sous classe : Gamopétales

Ordre : Myrtiflorales

Famille: Punicacées

Genre: Punica

Espèce: *Punica granatum* (Bridel *et al.*, 2004) ; (Quezel et Santa, 1963).

c. Composition chimique

L'étude phytochimique de *P. granatum* révèle sa richesse en polyphénols (tanins, flavonoïdes, anthocyanes...) et d'autres composés tels que les alcaloïdes ainsi que la présence des sucres, des acides organiques, des acides aminés, des stéroïdes, et des sels minéraux selon la partie de la plante (Gil *et al.*, 2000 ; Lansky et Newman, 2007 ; Syed *et al.*, 2007).

d. Activités biologiques de *P. granatum*

Plusieurs parties de *P. granatum* ont été étudiées expérimentalement afin de confirmer les activités biologiques provoquées traditionnellement par cette plante.



En plus, *P. granatum* est visé actuellement pour traiter d'autres maladies comme le SIDA, les maladies cardiovasculaires, les symptômes allergiques et le cancer.

Elle est utilisée aussi en hormonothérapie et dans le domaine de cosmétique (Shiraishi *et al.*, 2002) ; (Aviram et Dornfeld, 2003 ; Afaq *et al.*, 2005 ; Maoyadi, 2004) ; (Kawamada et Shimada, 2002) ; (Curry, 2004).

Le tableau 03 regroupe les principales activités biologiques étudiées de différentes parties de *Punica granatum*.

Tableau 03 : Quelques activités biologiques de *Punica granatum* citées dans la littérature scientifique

Activités biologiques	Partie de la plante	Références
Anticancéreuse	<ul style="list-style-type: none"> • Fruit complet • Jus de fruit 	<ul style="list-style-type: none"> • (Syed <i>et al.</i>, 2007 ; Lansky et Newman , 2007) • (Seeram <i>et al.</i>, 2005)
Antiinflammatoire	<ul style="list-style-type: none"> • Fruit complet 	<ul style="list-style-type: none"> • (Lansky et Newman , 2007)
Antioxydante	<ul style="list-style-type: none"> • Epicarpe • Graines • Jus de fruit • Fleurs 	<ul style="list-style-type: none"> • (Ricci <i>et al.</i>, 2006 ; Chidambara <i>et al.</i>, 2002 ; Rout et Banerjee., 2007 ; Surveswaran <i>et al.</i>, 2007) • (Schubert <i>et al.</i>, 1999) • (Rosenblat <i>et al.</i>, 2006 ; Seeram <i>et al.</i>, 2005) • (Kaur <i>et al.</i>, 2006 ; Bagri <i>et al.</i>, 2008 ; Stangeland <i>et al.</i>, 2009)
Antimicrobienne	<ul style="list-style-type: none"> • Fruit complet • Epicarpe 	<ul style="list-style-type: none"> • (Braga <i>et al.</i>, 2005) • (Prashanth <i>et al.</i>, 2001a ; Calzada <i>et al.</i>, 2006 ; Voravuthikunchai <i>et al.</i>, 2005)
Antidiarrhéique	<ul style="list-style-type: none"> • Graines 	<ul style="list-style-type: none"> • (Das <i>et al.</i>, 1999)

e. *Punica granatum* et le diabète sucré

A l'heure actuelle, différentes parties de la plante sont utilisées pour traiter la maladie. D'après les informations ethnobotaniques recueillies par Marles et Farnsworth (1995), les fruits de *Punica granatum* sont utilisés en Inde dans le traitement du diabète. C'est les graines qui sont utilisés en Brésil et Bangladesh alors que dans d'autres régions du monde, ce sont les fleurs (Das *et al.*, 2001).

Dans les pays du Maghreb, plusieurs enquêtes ethnobotaniques montrent que principalement l'épicarpe de fruits de *P. granatum* en décoction est utilisé en médecine populaire pour traiter le diabète sucré.

Dans la région de « Tafilalet » (Maroc), l'enquête effectuée par Eddouks *et al.* (2002) montre que 29 personnes parmi 320 diabétiques dans la région utilisent l'épicarpe de cette plante pour traiter le diabète.

Une autre enquête toujours en Maroc mais dans la région de « Errachidia Province » réalisée par Tahraoui *et al.* (2007), montre aussi l'utilisation traditionnelle de l'épicarpe de grenadier pour traiter la maladie diabétique.

Dans notre pays et principalement dans la région de Tlemcen, *Punica granatum* (épicarpe) est parmi les plantes utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète sucré d'après les informations ethnobotaniques recueillies par Benmehdi en 2000.

8. Les tanins

a. Définition

Les tannins sont des métabolites secondaires polyphénoliques, hydrolysables de masse molaire entre 500-2000 Da (Khanbaba et Ree, 2001). Leur structure chimique leur confère une capacité très développée de se fixer sur des molécules telles que les alcaloïdes, la gélatine, les polysaccharides, et essentiellement les protéines (Zimmer et Cordesse, 1996 ; Bruneton, 1999). Parmi les caractéristiques des tannins leur goût astringent qui est une sensation tactile due à la précipitation des protéines salivaires et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche (Peronny, 2005).

Le rôle biologique des tanins dans la plante est lié à sa propre protection contre les infections, les insectes et les animaux herbivores (Khanbaba et Ree, 2001), en plus de la protection contre les infections fongiques et bactériennes (Peronny, 2005).

b. Localisation et distribution

Les tannins sont très répandus dans le règne végétale, ils sont particulièrement abondants chez les conifères, les fagacées, les rosacées (Ghestem *et al.*, 2001).

Tous les organes végétaux peuvent en renfermer (l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits, les racines, les graines) (Khanbaba et Ree, 2001). Les tannins sont présents dans une variété de plantes utilisées dans l'alimentation notamment les céréales et les légumineuses (sorgho, millet, orge, haricots secs, petit pois, caroube) et les fruits comme (pomme, mûre, canneberge, datte, raisin, aubépine, pêche, poire, kaki et fraise (Peronny, 2005).

c. Structure chimique et classification

À la base de leur caractéristique structurale, il est possible de diviser les tannins en 2 groupes : les tannins condensés (proanthocyanidines) et les tannins hydrolysables.

➤ Tannins condensés (ou proanthocyanidines)

Ce sont des polymères ou oligomères flaviniques, constitués d'unités flavan-3-ol, le plus souvent épicatechine et catéchine, avec un degré de polymérisation entre deux et plus de 50 unités (Khanbabaee et Ree, 2001) (Fig. 02).

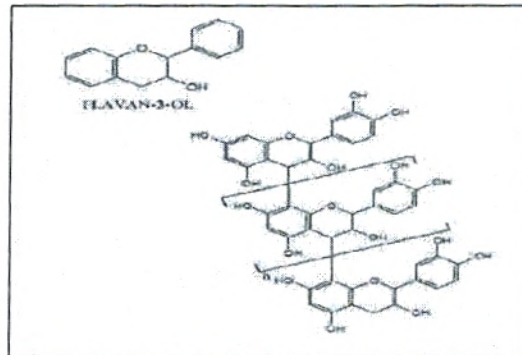


Figure 02 : structure des tannins condensés et leur monomère (Peronny, 2005).

➤ Tanins hydrolysables

Ce sont des oligo ou polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable d'acide phénolique. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénolique soit l'acide gallique dans le cas des tannins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés dans le cas des tanins éllagiques (Bruneton, 1999) (Fig.03).

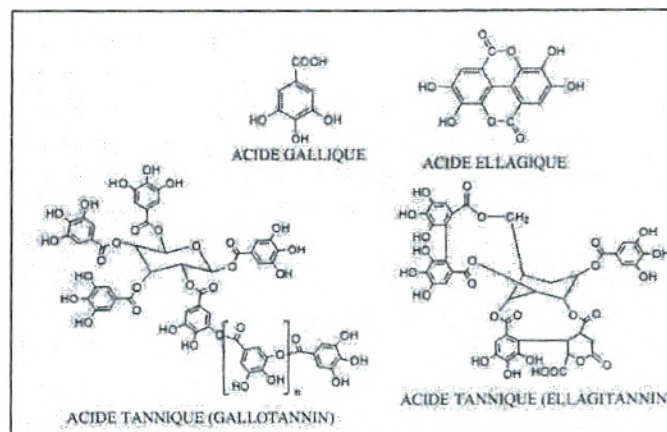


Figure 03 : Structure des tanins hydrolysables et les acides associés ((Peronny, 2005).

d. Activités biologiques et thérapeutiques des tannins

Les tannins sont des molécules biologiquement actives, douées d'activités pharmacologiques remarquables et des effets significatifs sur la santé humaine (Chavan *et al.*, 2001 ; Okuda, 2005).

Les tanins possèdent une activité antimicrobiennes, activités antibactérienne, activité antivirale, activité antifongique et anti-levure (Chung et Wei, 2001 ; De Bruyne *et al.*, 1999).

- **Activité antioxydante des tanins**

Les tanins ont de grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénols (Peronny, 2005). Elles ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto oxydation (Perret, 2001).

Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficace que les phénols simples (Peronny, 2005). De même, il a été démontré *in vitro* que les tanins sont plus actifs que les vitamines. Des études faites montrèrent que les procyanidines B₁ et B₃ sont des antioxydants pour l'acide linoléique, et ils ont une activité antioxydante supérieure à celle de l'acide ascorbique.

Dans une autre étude faite sur la propriété du piégeage radicalaire, il a été remarqué que les procyanidines dimériques peuvent emprisonner 8 radicaux pyroxyles alors que l'acide ascorbique emprisonne un seul radical.

Matériel et Méthodes

Notre étude expérimentale réalisée au sein du laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » du département de Biologie, comporte trois grandes parties :

Partie I : Extraction des proanthocyanidines à partir de l'épicarpe de *P. granatum*;

Partie II : Evaluation de l'activité antioxydante des proanthocyanidines *in vitro* ;

Partie III : qui consiste à étudier :

- ✓ *In vivo* : l'influence des proanthocyanidines sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale chez les rats normaux ;
- ✓ *In vitro* : l'activité inhibitrice des proanthocyanidines vis-à-vis de l' α -amylase, enzyme responsable de l'hydrolyse de certains polysaccharides.

1. Matériel végétal

1.1. Récolte et préparation

Les fruits de grenadier (*P. granatum*) sont récoltés à maturité le mois d'Octobre (2007), dans la région de Tafna, Wilaya de Tlemcen.

L'épicarpe de ces fruits est isolé, séché à l'air libre et à l'abri de la lumière, puis broyé à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

1.2. Extraction des proanthocyanidines

Dans un ballon, 10 g de poudre fine de l'épicarpe de grenadier sont mélangés avec 400 mL d'une solution d'eau-acétone (70/30 : v/v). L'ensemble est porté à une macération pendant 3 jours. Le macérât obtenu est filtré puis évaporé à 40°C. La phase aqueuse est extraire deux fois avec 50 mL d'éther de pétrole afin d'éliminer les pigments et les lipides. La phase aqueuse ainsi obtenue est décantée quatre fois avec 50 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est évaporée à sec à 40°C (Bruneton , 1999) (Fig. 04).

• Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extrait sec obtenu après évaporation de l'acétate d'éthyle est calculé selon le rapport suivant :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P_1 - P_2}{P_3} \times 100$$

P1 : Poids du ballon après évaporation ;

P2 : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide) ;

P3 : Poids de la matière végétale de départ.

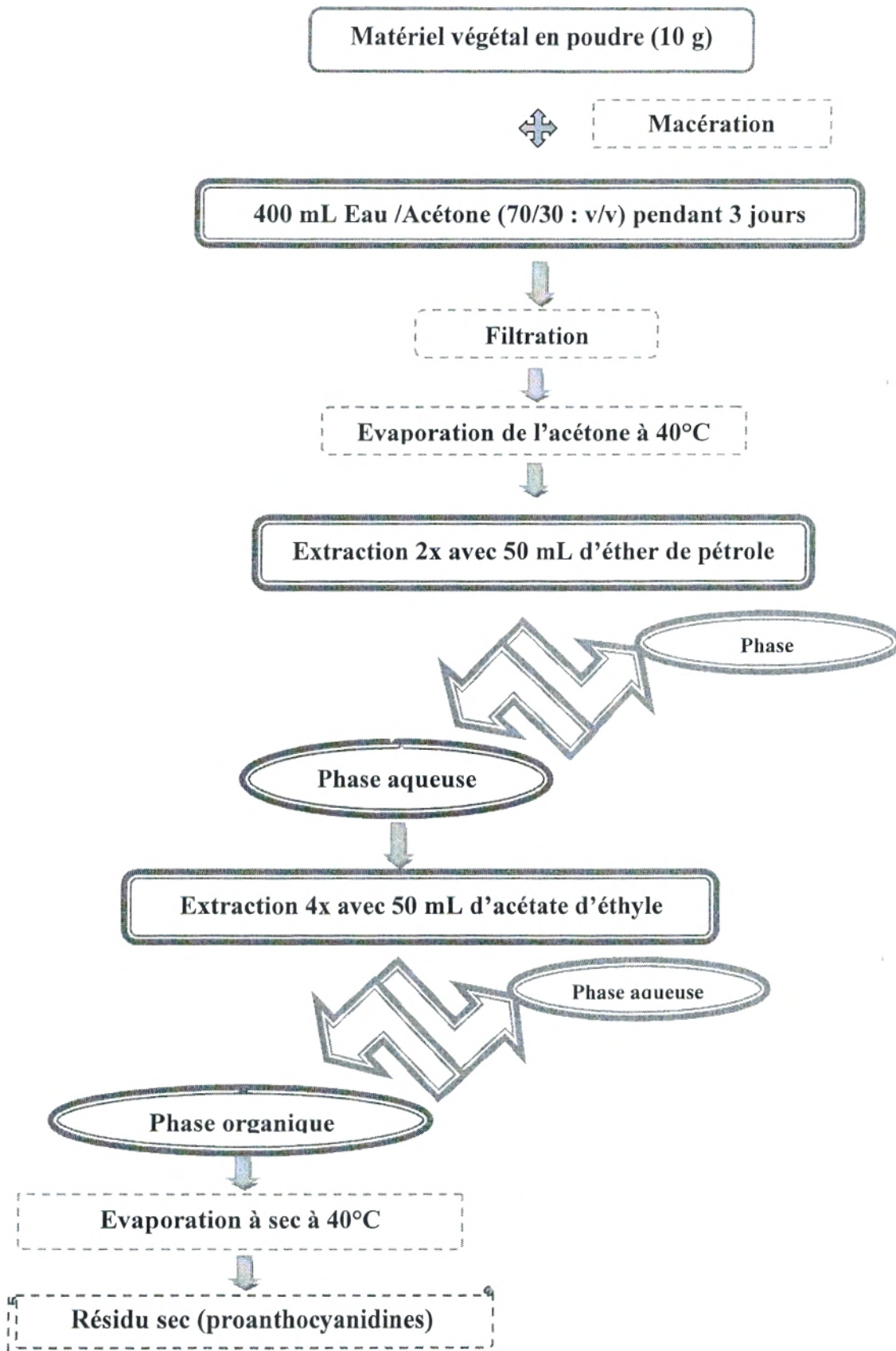


Figure 04: Protocol d'extraction des proanthocyanidines (Bruneton , 1999)

• Mise en évidence des proanthocyanidines

Pour mettre en évidence la présence des proanthocyanidines au niveau de l'extrait sec obtenu après évaporation de l'acétate d'éthyle, nous avons réalisé le test suivant :

1g de l'échantillon est transféré dans un tube à essai contenant 10 mL d'HCL à 2M. Le tout est incubé dans un bain marie pendant 30 min. L'apparition d'une couleur rouge après refroidissement, indique la présence des proanthocyanidines au niveau de l'extrait étudié (Harbone, 1998).

1.3. Dosage des polyphénols

La méthode utilisée pour le dosage des polyphénols au niveau de notre extrait, est celle utilisant le réactif de Folin Ciocalteu.

➤ Principe

Le réactif de Folin est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène .

La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 700 et 750 nm, est proportionnelle à la quantité polyphénols présente dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

➤ Mode opératoire

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par Vermerius et Nicholson, 2006.

0.1 mL de l'extrait étudié est mélangé avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée, le tout est agité par un vortex. Après 5 min, 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (1N) sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 30 min à la température ambiante. la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g).

La teneur en polyphénols est calculée selon la formule suivante :

$$T = (X_1 \cdot F) / X_2$$

T : Teneur des polyphénols ;

X₁ : Concentration déterminée à partir de la courbe d'étalonnage ;

F : Facteur de dilution ;

X_2 : Concentration initiale de l'extrait.

2. Étude de l'activité antioxydante des proanthocyanidines par la méthode de *FRAP* (*Ferric reducing antioxidant power*) :

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice du fer de notre extrait est déterminée selon la méthode décrite par **Oyaizu 1986**, basée sur la réaction chimique de réduction du Fer (III) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ (ferricyanure de potassium) en Fe (II) (*in Pan et al., 2008*).

L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé (**Hubert, 2006**).

➤ *Mode opératoire*

Le protocole expérimental suivi est celui de **Karagözler et al., 2008**.

1 mL de l'échantillon à différentes concentrations (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 et 0.5 mg/mL), est mélangé avec 2.5 mL d'une solution tampon phosphate (0.2M ; pH 6.6) et 2.5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%.

Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. Ensuite, 2.5 mL d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min.

A 2.5 mL du surnageant, 2.5 mL d'eau distillée et 500 μ L d'une solution de chlorure du fer ($FeCl_3, 6H_2O$) à 0.1% sont ajoutés au mélange.

La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience, aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions opératoires.

3. Influence des proanthocyanidines sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale *in vivo*

3.1. Les animaux

Notre étude expérimentale est réalisée sur des rats blancs « *Rattus norvegicus* » variété Wistar, âgés de 3 mois avec un poids corporel de 160 à 180g.

L'élevage de ces animaux s'est déroulé au sein de l'animalerie du département de Biologie sous des conditions favorables de vie : température (25 à 30°C) et un taux d'humidité entre 60 et 70% avec une photopériode de 12h/12h.

Les animaux sont nourris avec un aliment « EL ALF » d'AIN FEZZA dont la composition est indiquée dans le tableau 04. L'eau de robinet et l'aliment leur sont fournis *ad libitum*.

Tableau 04 : Composition de l'aliment « EL ALF » en pourcentage

Constituants	glucides	Protéines brutes	Graisses brutes	Cendres brutes	Cellulose brute	CMV+ minéraux	Teneur en eau
Pourcentage	52,8	17,4	3,6	6,2	5,0	1	14

3.2. Effet des proanthocyanidines sur l'HGPO

Afin d'évaluer l'effet des proanthocyanidines de l'épicarpe de *P. granatum* sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale, deux groupes de rats sont préparés dont chacun comporte trois lots (n=5) (Tabl. 05).

L'état d'hyperglycémie est provoquée chez ces animaux par gavage d'une solution de :

- ✓ Saccharose pour le groupe 01 à 4 g/kg p.c.
- ✓ Amidon pour le groupe 02 à 5 g/kg p.c.

L'administration de l'extrait est effectuée par voie orale à une dose de 400 mg/kg p.c. en même temps avec la solution sucrée.

Après un jeun de 16 h., la glycémie des différents lots est mesurée dans un intervalle de 3h. (t_0 , t_{30} , t_{60} , t_{120} et t_{180} min) à l'aide d'un glucomètre à bandelettes réactives (Accu-Chek Active) à partir de l'extrémité caudale des animaux.

Tableau 05 : Répartition des rats normaux soumis à un test d'HGPO.

Groupes	Groupe 01	Groupe 02
Lots		
Lot 01 : Témoins	4 g/kg de saccharose	5 g/kg d'Amidon
Lot 02 : Expérimental	4 g/kg de saccharose + 400 mg/kg Proanthocyanidines.	5 g/kg d'Amidon + 400 mg/kg Proanthocyanidines.
Lot 03 : Contrôle positif	4 g/kg de saccharose + 50 mg/kg d'acarbose	5 g/kg d'Amidon + 50 g/kg d'acarbose

4. Effet des proanthocyanidines sur l'activité de l' α -amylase *in vitro*

4.1. Matériels

• Réactif 3,5-dinitrosalicylique (DNSA)

Dans un Erlen Meyer, 1 g de DNSA est dispersé dans 40 mL d'eau distillée. A cette solution 30 g de tartrate double de sodium et de potassium sont ajoutés sous agitation. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. L'addition de 20 mL d'une solution de NaOH

2N rend le réactif limpide avec une couleur orange. Le volume obtenu est ajusté à 100 mL avec de l'eau distillée. Le réactif obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à +4°C.

- **Solution d' α -amylase**

L'enzyme utilisée est l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* (E.C.3.2.1.1) sous forme lyophilisée (Fluka), son poids moléculaire est de 51000 Da avec une activité spécifique de 26 UI/mg, conservée à +4°C.

Un gramme d' α -amylase est solubilisé dans 100 mL de solution tampon phosphate (0.02 M, pH 6). La solution obtenue contient une activité α -amylasique de 260 UI/mL.

A partir de cette solution mère nous avons préparé une solution dont l'activité enzymatique finale de l' α -amylase dans le milieu réactionnel est de 1.3 UI/mL.

L'optimum de l'activité α -amylasique d'*Aspergillus oryzae* est à pH 6 pour une température de 25°C.

- **Solutions de substrat**

Le substrat utilisé dans cette expérience est l'amidon soluble de pomme de terre (Merk). Les concentrations finales d'amidon trouvées dans le milieu réactionnel sont : 1.25, 1.5, 2 et 3 g/l. Ces concentrations sont préparées dans la solution tampon phosphate (0.02M, pH 6)

- **Solutions des proanthocyanidines de *P. granatum***

Différentes concentrations d'extrait étudié sont préparées dans la solution tampon phosphate (0.02 M, pH 6) afin d'évaluer leur effet sur l'activité enzymatique de l' α -amylase. Les concentrations finales sont 0.5, 1, 1.5, et 2 g/l

- **Solution de maltose (étalon)**

Une gamme d'étalonnage de différentes concentrations de maltose est nécessaire pour déterminer la quantité du maltose produite après hydrolyse enzymatique de l'amidon, (Tabl. 06).

Tableau 06 : Gamme d'étalonnage du maltose.

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solution de maltose (mL)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
Tampon phosphate (mL)	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0
Volume final (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4	4
[Maltose] mMol	0	0.69	1.35	2.08	2.77	3.47	4.16	4.85	5.5

4.2. Méthodes

a/ Dosage des sucres réducteurs par la méthode de Bernfeld (1955)

Cette méthode de dosage est basée sur le caractère réducteur des groupements aldéhydes et cétones libres des sucres. En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation de ces fonctions provoque simultanément la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique de couleur jaune orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique de couleur rouge orange qui absorbe à 540 nm. L'intensité de la coloration varie selon la quantité de sucres réducteurs présente dans le milieu réactionnel (Bernfeld, 1955 ; In Negi et Baner, 2006).

➤ Mode opératoire

- Dans une série de tubes à essai on introduit 1mL de réactif DNSA, puis 1mL du milieu à doser (Etalon ou milieu réactionnel*) ;
- Les tubes sont agités et placés dans un bain mari bouillant pendant 5 min ;
- Les tubes sont immédiatement refroidis dans un bain d'eau glacée afin de stopper la réaction entre le maltose et le réactif DNSA ;
- On ajoute 10mL d'eau distillée dans chaque tube, puis on homogénéise à l'aide d'un vortex ;
- Les densités optiques sont lues contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 540 nm.

* Milieu réactionnel = solution enzymatique+solution d'amidon

ou = solution enzymatique+solution d'amidon+solution d'extrait.

b/ Mesure de la vitesse initiale

La vitesse initiale de la réaction enzymatique, est la mesure de la quantité de produit apparu ou le substrat disparu pendant les premières minutes de la réaction enzymatique.

Dans cette expérience, le produit formé après hydrolyse enzymatique de l'amidon par l' α -amylase est le maltose, qui est un sucre réducteur formé de deux sous unités α -D-glucopyranose après rupture des liaisons $\alpha 1 \rightarrow 4$ -glucosidiques à n'importe quel endroit à l'intérieur de la molécule de polyside.

La vitesse initiale de la réaction enzymatique est mesurée à partir des pentes des droites « [Produit]= f (tps) » après hydrolyse enzymatique de substrat selon la formule suivante :

$$V_i = \Delta P / \Delta t$$

V_i : vitesse initiale

ΔP : différence entre deux concentrations du produit formé

Δt : différence entre deux temps de la réaction

c/ Détermination des paramètres cinétique de l' α -amylase

Les paramètres cinétiques de l' α -amylase (V_{max} et K_m), sont déterminés en utilisant la représentation en double inverse, celle de *Lineweaver Burk* ($1/V_i=f(1/[S])$), qui permet de déterminer précisément les paramètres cinétiques de l' α -amylase.

d/ Détermination des paramètres cinétiques en présence des proanthocyanidines

La présence de l'extrait à différentes concentrations permet de déterminer :

- ✓ Les vitesses initiales (V_i) : en utilisant la représentation linéaire $[\text{Produit}]=f(\text{tps})$;
- ✓ Les vitesses maximales (V_{max}) et les constantes de Michaelis (K_m) : en utilisant la représentation de *Lineweaver Burk* : ($1/V_i=f(1/[S])$) ;
- ✓ Les pourcentages d'inhibition : calculés selon la formule suivante :

$$\%I = \frac{V_{i_1} - V_{i_2}}{V_{i_1}} \times 100$$

$\%I$: pourcentage d'inhibition

V_{i_1} : Vitesse initiale en absence d'inhibiteur

V_{i_2} : Vitesse initiale en présence d'inhibiteur

- ✓ La concentration inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique (IC_{50}) : en utilisant la représentation : $\%I=f[I]$;
- ✓ La constante d'inhibition (K_i) : en utilisant la représentation de Dixon : $1/V_i=f[I]$ (I: inhibiteur).

5. Analyse statistique

- La moyenne (m)
$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_1 X_1$$

- La variance (v)
$$V_x = \frac{1}{n} \sum (X_1 - \bar{X})^2$$

- L'écart type (σ)
$$\sigma_x = \sqrt{V_x}$$

- L'erreur standard de la moyenne (ESM)

$$Sm = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

- **Test de Student**

Pour comparer les moyennes des deux échantillons indépendants, nous avons appliqué le test de student « t_e » à un degré de liberté qui dépend de la taille de l'échantillon.

$$t_e = \frac{|\overline{X}_1 - \overline{X}_2|}{\sqrt{\sigma^2 \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}}$$

La valeur de « t_e » donne le degré de signification « p » lu sur la table de Student. La différence entre deux moyennes est :

- ✓ Peu significative si $p < 0,05$ (*)
- ✓ Significative si $p < 0,01$ (**)
- ✓ Très significative si $p < 0,001$ (***)
- ✓ Hautement significative si $p < 0,0001$ (****)

- **Pourcentage de variation de la glycémie**

Les teneurs en glucose sont exprimées en g/l et les variations de la glycémie sont exprimés en pourcentage par rapport à la glycémie basale et sont calculés selon la formule suivante :

$$\%G = \frac{(G_t - G_0)}{G_0} \times 100$$

$\%G$: pourcentage de variation de la glycémie

G_0 : glycémie basale (t_0 min)

G_t : glycémie à un temps précis

Résultats et interprétation

1. Rendement d'extraction

Après évaporation à sec de l'acétate d'éthyle l'extrait obtenu est sous forme d'une poudre avec une couleur marron avec un rendement de 5%.

2. Dosage des polyphénols

Les différentes concentrations de l'acide gallique utilisé comme étalon pour le dosage des polyphénols, nous a permis d'obtenir une droite représentée sur la figure 05 ($R^2 = 0.993$).

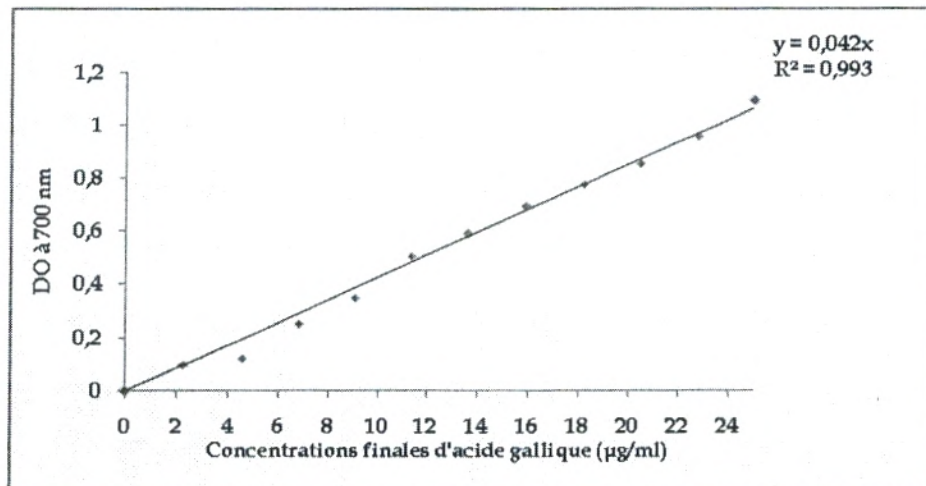


Figure 05: Courbe étalon de l'acide gallique ($\lambda=700$ nm)

A partir de cette courbe, nous pouvons déterminer la teneur en polyphénols de l'extrait étudié exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche. Cette teneur est de 444.30 mg GAE/g, ce qui indique la richesse de la plante en ces composés.

3. Activité antioxydante des proanthocyanidines par la méthode de FRAP

L'activité antioxydante des proanthocyanidine de *P. granatum* par la méthode de FRAP donne les résultats représentés sur la figure 06.

D'après ce résultat, nous avons remarqué que l'extrait étudié présente une activité très puissante pour réduire le fer. Cette activité est similaire avec celle de l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif, reflétée par les densités optiques obtenues à différentes concentrations de celui-ci.

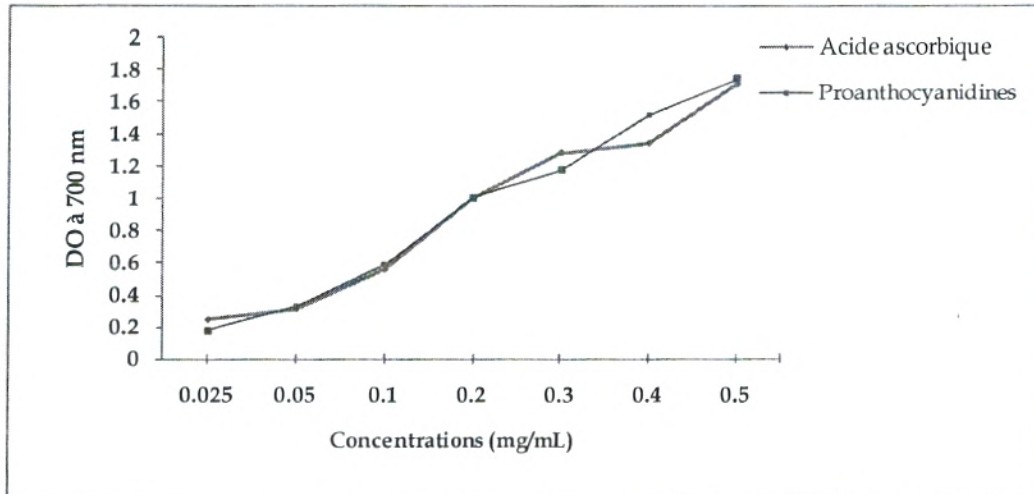


Figure 06: Pouvoir antioxydant des proanthocyanidines de l'épicarpe de *P. granatum* par la méthode de *FRAP*

4. Influence des proanthocyanidines sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO)

4.1. HGPO (saccharose à 4 g/kg p.c.)

La co-administration de 400 mg/kg p.c. des proanthocyanidines de *P. granatum* et la solution de saccharose à 4 g/kg p.c. par voie orale aux rats normaux, donne les résultats représentés sur le tableau 07 et la figure 07.

Tableau 07: Variation de la glycémie chez les rats soumis à une HGPO (saccharose à 4 g/kg) et traités par les proanthocyanidines de l'épicarpe de *P. granatum* par voie orale.

Lots	Temps (min)	Glycémie (g/l)				
		0	30	60	120	180
Lot 01 : Témoins (NaCl 0.9%)		0.92±0.035	1.27±0.024 (38%)	1.30±0.057 (42%)	1.02±0.015 (11%)	0.99±0.010 (8%)
Lot 02 : Expérimental (Proanthocyanidines 400mg/kg p.c.)		0.70±0.063	1.12±0.041 (60%)	1.25±0.046 (79%)	1.32±0.020 (89%)	1.10±0.028 (57%)
Lot 03 : Contrôle positif (Acarbose 50mg/kg p.c.)		0.59±0.041	0.74±0.068 (26%)	0.71±0.066 (21%)	0.71±0.077 (20%)	0.73±0.077 (24%)

Chaque valeur représente la moyenne ±ESM

(%) : pourcentage de variation de la glycémie par rapport à t₀ min

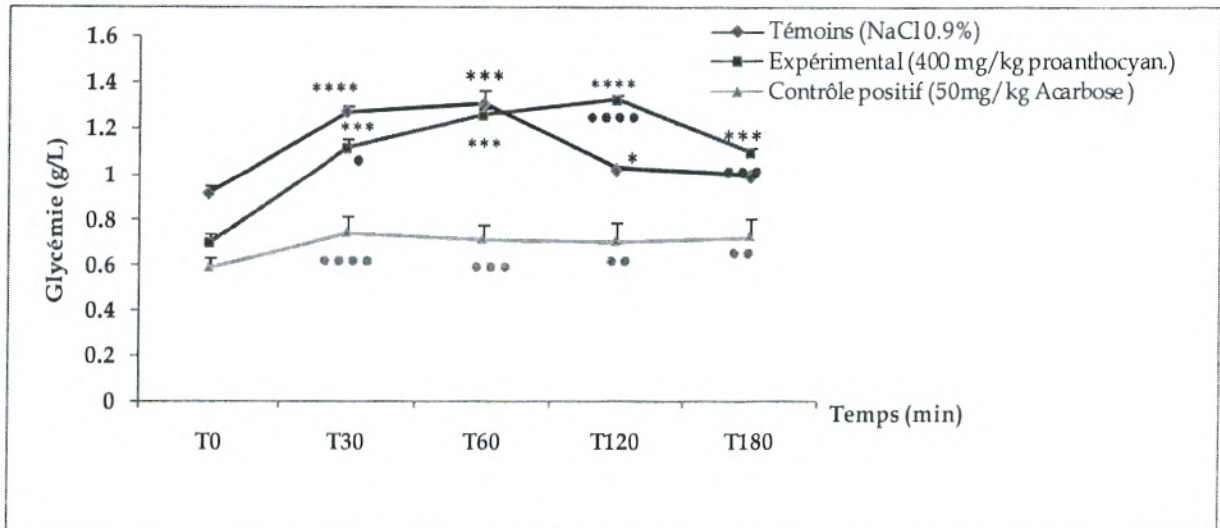


Figure 07 : Evolution de la glycémie durant 3h chez des rats normaux soumis à une HGPO (saccharose à 4 g/kg) et traités par les proanthocyanidines de l'épicerpe de *P. granatum* par voie orale (400 mg/kg).

* ($P < 0.05$) : degré de signification par rapport à t_0 min

• ($P < 0.05$) degré de signification par rapport aux témoins

D'après ces résultats, nous pouvons noter que le gavage de 4 g/kg p.c. d'une solution de saccharose, provoque chez les rats témoins une augmentation hautement significative de la glycémie de 0.92 à 1.27 g/L à la 30^{ème} et à 1.30 g/L à la 60^{ème} min de l'expérience avec un pourcentage de 38% et 42% respectivement.

Chez les rats traités par les proanthocyanidines de *P. granatum* à une dose de 400 mg/kg p.c., la glycémie augmente très significativement à la 30^{ème} min de l'expérience avec un pourcentage de 60 % par rapport à l'état initiale et une glycémie de 1.12 g/L. Cette valeur est moins importante que celle des témoins (1.27 g/L). Par la suite, la glycémie augmente progressivement pour atteindre un seuil maximal à la 120^{ème} min de l'expérience avec une valeur de 1.32 g/L (89%) puis diminue à la fin de l'expérience (1.10 g/L).

Chez les rats du 3^{ème} lot (acarbose à 50 mg/kg p.c.), la glycémie augmente significativement par rapport aux témoins à la 30^{ème} min avec un pourcentage de 26% (0.74 g/L). Cette glycémie reste stable jusqu'à la fin de l'expérience, ce qui indique que l'acarbose empêche l'augmentation de la glycémie après une surcharge orale en saccharose. Cet effet est expliqué par l'inhibition exercée par l'acarbose au niveau intestinale vis-à-vis des α -glucosidases, enzymes responsables de l'hydrolyse des disaccharides comme le saccharose (Wens *et al.*, 2007).

4.2. HGPO (amidon à 5 g/kg p.c.)

L'administration de 400 mg/kg p.c. par voie orale des proanthocyanidines de l'épicarpe de *P. granatum*, aux rats normaux soumis à une HGPO par gavage d'une solution d'amidon à 5 g/kg p.c. donne les résultats représentés dans le tableau 08 et la figure 08:

Tableau 08: Variation de la glycémie chez les rats soumis à une HGPO (Amidon 5 g/kg) et traités par les proanthocyanidines de l'épicarpe de *P. granatum* par voie orale.

Lots	Temps (min)	Glycémie (g/l)				
		0	30	60	120	180
Lot 01 : Témoins (NaCl 0.9%)		0.75±0.07	1.63±0.16 (116%)	1.51±0.05 (101%)	1.28±0.12 (70%)	1.07±0.07 (42%)
Lot 02 : Expérimental (Proanthocyanidines 400mg/kg p.c.)		0.60±0.026	1.12±0.105 (86. %)	1.32±0.107 (119%)	1.26±0.079 (110%)	1.12±0.047 (86%)
Lot 03 : Contrôle positif (Acarbose 50mg/kg p.c.)		0.90±0.03	1.18±0.07 (30 %)	1.04±0.04 (15%)	1.06±0.06 (17%)	1.06±0.01 (16%)

Chaque valeur représente la moyenne ±ESM

(%) : pourcentage de variation de la glycémie par rapport à t₀ min

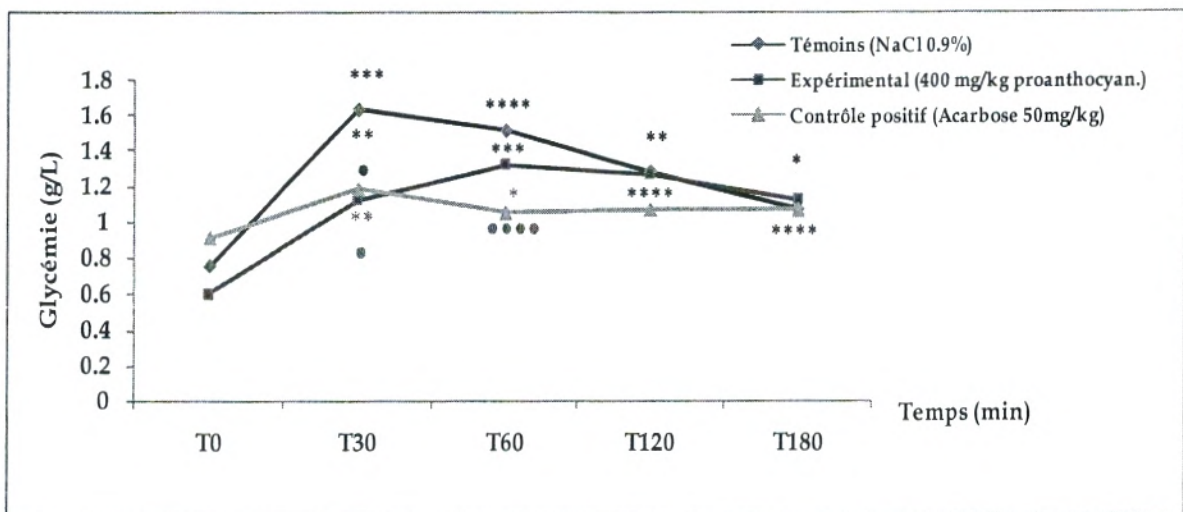


Figure 08 : Evolution de la glycémie durant 3h chez des rats normaux soumis à une HGPO (Amidon à 5 g/kg) et traités par les proanthocyanidines de l'épicarpe de *P. granatum* par voie orale (400mg/kg).

* (P<0.05) : degré de signification par rapport à t₀ min

● (P<0.05) degré de signification par rapport aux témoins.

Dans cette expérience, l'hyperglycémie est provoquée par une solution d'amidon à 5 g/kg p.c. Cette dose, provoque chez les rats témoins une hyperglycémie de 1.63 g/L à la 30^{ème} min avec une variation de 116% par rapport à t₀ min. Cette augmentation très significative persiste jusqu'à la 60^{ème} min avec une glycémie de 1.51 g/L (101%), puis diminue progressivement pour atteindre une valeur normale de 1.07 g/L à la 180^{ème} min de l'expérience.

Chez les rats traités par les proanthocyanidines à une dose de 400 mg/kg p.c. par voie orale, la glycémie augmente significativement durant la 1^{ère} heure mais avec un taux moins important que celui des rats témoins. A la 30^{ème} min où la glycémie est maximale chez les témoins (1.63 g/L), elle atteint uniquement une valeur de 1.12 g/L (86%) chez les rats expérimentaux et 1.32 g/L (119%) comme un taux maximal à la 60^{ème} min. Par la suite, elle diminue progressivement jusqu'à la 180^{ème} min (1.12 g/L).

Chez les rats traités par l'acarbose à 50 mg/kg p.c., la glycémie augmente significativement pour atteindre un taux maximal à la 30^{ème} min avec un pourcentage de 30% (1.18 g/L). Cette glycémie diminue au cours de l'expérience et reste pratiquement stable aux alentours de 1 g/L, ce qui est expliqué par l'effet inhibiteur de l'acarbose vis-à-vis de l' α -amylase et l' α -glucosidases, enzymes responsables de l'hydrolyse des hydrates de carbone (polyoside et disaccharide respectivement) par conséquence une diminution de l'hyperglycémie postprandiale (Wens *et al.*, 2007 ; Wong et Robertson 2003).

5. Effet des proanthocyanidines sur l'activité de l' α -amylase *in vitro*

5.1. Courbe d'étalonnage

La gamme d'étalonnage réalisée avec le maltose donne une droite représentée graphiquement sur la figure 09 ($R^2 = 0.997$; $y = 0.111x$).

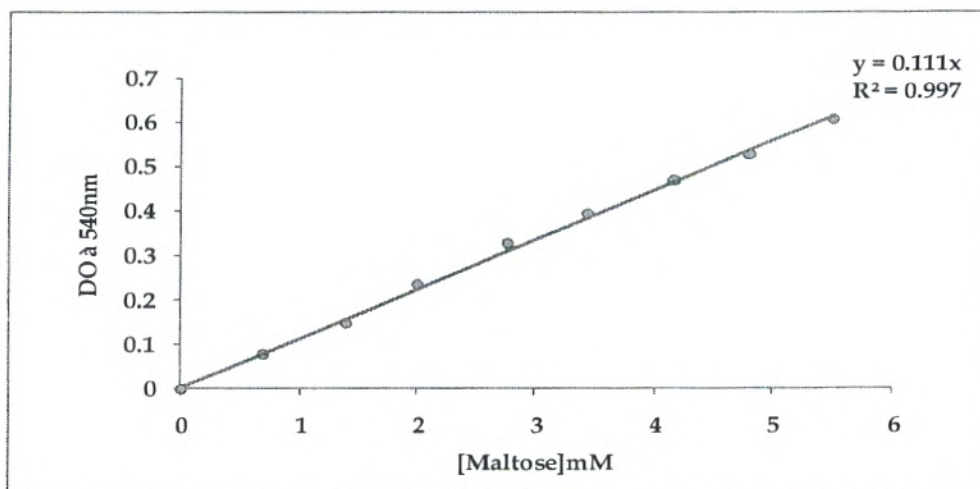


Figure 09 : Courbe d'étalonnage du maltose ($\lambda = 540\text{nm}$).

5.2. Cinétique enzymatique de l'α-amylase en absence d'inhibiteur

5.2.1. Mesure des vitesses initiales

Afin de déterminer les vitesses initiales de la réaction enzymatique, nous avons choisi différentes concentrations finales de substrat à savoir 1.25 ; 1.5 ; 2 et 3 g/L et une activité enzymatique finale de l'α-amylase égale à 1.3 UI/mL dans le milieu réactionnel. Les vitesses initiales (V_i) sont les pentes des droites ($\Delta P/\Delta t$), tracées à travers les points expérimentaux des courbes qui correspondent aux concentrations de produit formé en fonction du temps (Fig. 10).

Pendant les premières minutes de la réaction enzymatique, nous avons constaté que les vitesses initiales restent constantes pour chacune des concentrations de substrat. Les vitesses initiales obtenues lors de cette réaction sont indiquées dans le tableau 09.

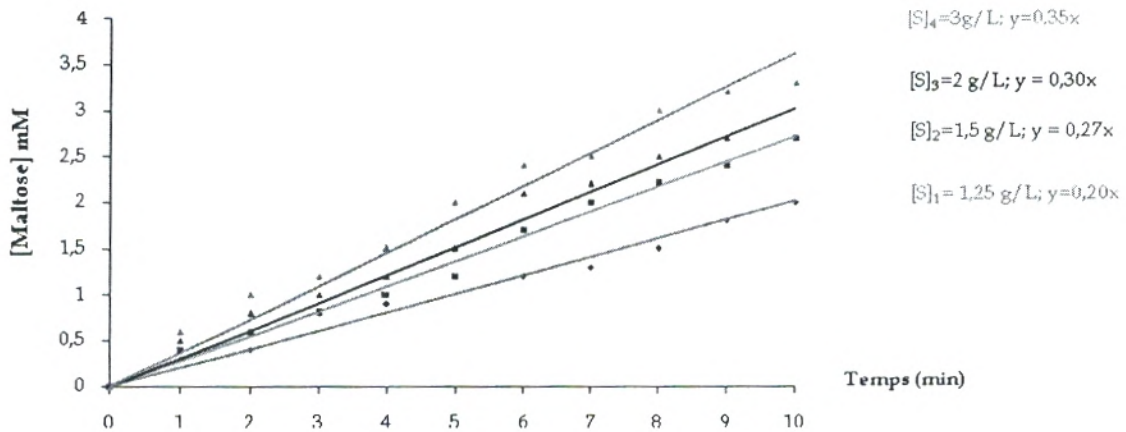


Figure 10: Effet de différentes concentrations d'amidon en fonction du temps sur l'activité de l'α-amylase (AE=1.3 UI/ml).

Tableau 09: Les vitesses initiales de la réaction enzymatique à différentes concentrations de substrat

[S] g/L	1.25	1.5	2	3
V_i (mM/min)	0.20	0.27	0.30	0.35



5.2.2. Détermination des paramètres cinétiques de l' α -amylase

La courbe en double inverse de *Lineweaver et Burk* ($1/V_i = f(1/[S])$), nous a permis de déterminer les paramètres cinétiques de l' α -amylase, qui sont la vitesse maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_m) qui correspond à la concentration en substrat à laquelle la catalyse enzymatique se produit à la moitié de sa vitesse maximale (Fig. 11).

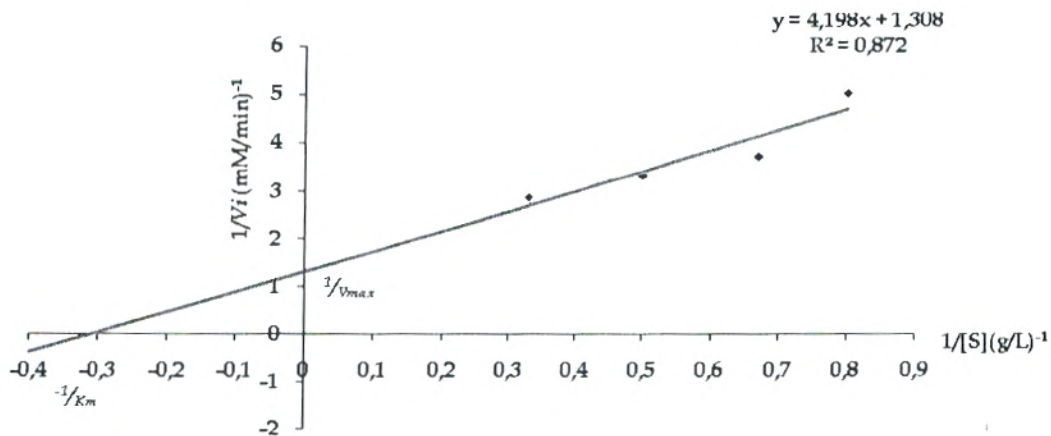


Figure 11: Représentation de *Lineweaver et Burk* de la réaction enzymatique à différentes concentrations de substrat.

La vitesse maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_m) calculées à partir de cette représentation, donnent les résultats suivants :

$$V_{max} = 0.77 \text{ mM/min}$$

$$K_m = 3.33 \text{ g/L}$$

5.3. Cinétique enzymatique en présence des proanthocyanidines de *P. grantaum*

Suivant le même mode opératoire, les différentes quantités de maltose produites en fonction du temps par hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence de différentes concentrations des proanthocyanidines de *P. granatum* sont représentées sur les figures qui suivent (Fig. 12, 13, 14, 15).

Les concentrations finales des proanthocyanidines sont : 0.5 ; 1 ; 1.5 et 2 g/L. Chacune de ces concentrations est testée avec les différentes concentrations d'amidon indiquées précédemment, dont l'activité enzymatique est maintenue constante (AE=1.3 UI/mL).

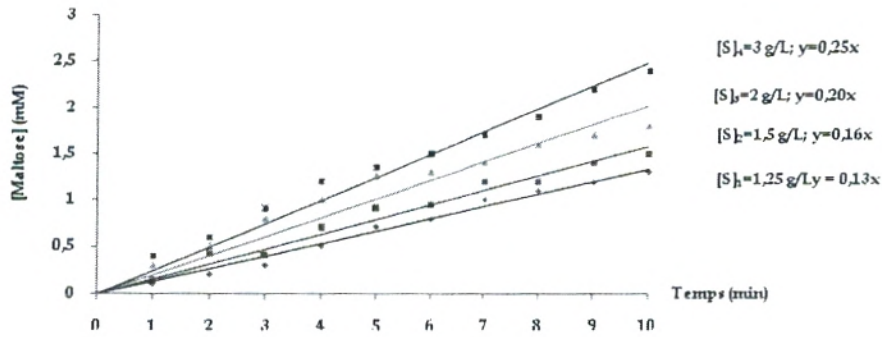


Figure 12 : Quantités du maltose (mM) produites en fonction du temps après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence des proanthocyanidines de *P. granatum* à 0.5 g/L (AE=1.3 UI/mL)

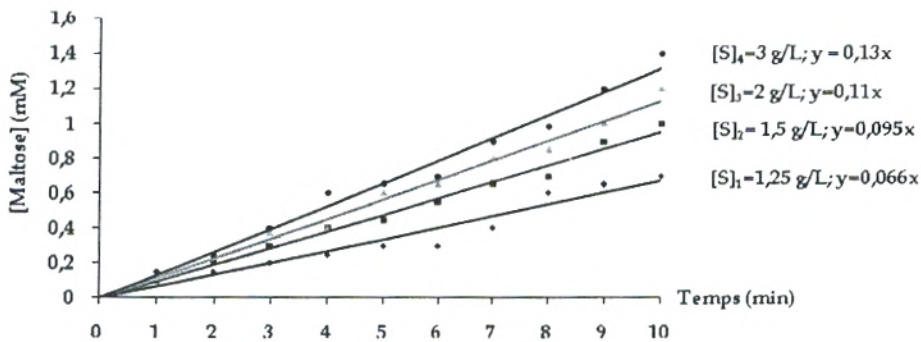


Figure 13 : Quantités du maltose (mM) produites en fonction du temps après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence des proanthocyanidines de *P. granatum* à 1 g/L (AE=1.3 UI/mL)

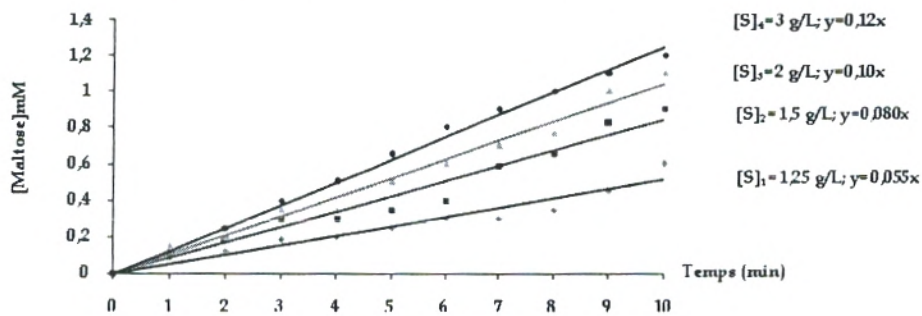


Figure 14 : Quantités du maltose (mM) produites en fonction du temps après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence des proanthocyanidines de *P. granatum* à 1.5 g/L (AE=1.3 UI/mL)

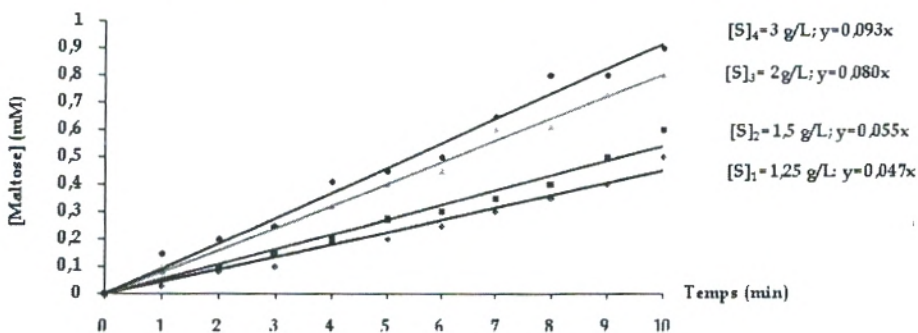


Figure 15 : Quantités du maltose (mM) produites en fonction du temps après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence des proanthocyanidines de *P. granatum* à 2 g/L (AE=1.3 UI/mL)

5.3.1. Mesure des vitesses initiales en présence des proanthocyanidines

Le tableau 10 regroupe les valeurs des vitesses initiales calculées à partir des courbes représentées sur les figures précédentes.

Tableau 10 : Les vitesses initiales exprimées en mM/min obtenues après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en absence et en présence de différentes concentrations des proanthocyanidines (AE=1.3 UI/ml).

[substrat] [Extrait]	[S] ₁ =1.25 g/l	[S] ₂ =1.5 g/l	[S] ₃ =2 g/l	[S] ₄ =3 g/l
[E]= 0 g/L	0.2	0.27	0.3	0.35
[E] ₁ =0.5 g/L	0.13	0.16	0.20	0.25
[E] ₂ =1 g/L	0.066	0.095	0.11	0.13
[E] ₃ =1.5 g/L	0.055	0.080	0.10	0.11
[E] ₄ =2 g/L	0.047	0.055	0.080	0.093

[E] : concentration de l'Extrait

D'après les résultats indiqués dans le tableau 10, nous avons observé une diminution relativement importante des vitesses initiales en présence de différentes concentrations des proanthocyanidines, par rapport à celle obtenues lors de la cinétique enzymatique en absence d'inhibiteur.

Les nouvelles vitesses initiales obtenues, diminuent quand la concentration des proanthocyanidines augmente dans le milieu réactionnel, c'est-à-dire, qu'elles sont inversement proportionnelles aux concentrations de l'extrait, ce qui signifie qu'il y a une inhibition de l' α -amylase par l'extrait des proanthocyanidines de l'épicarpe de *P. granatum*.

5.3.2. Détermination du mécanisme d'inhibition

Le mécanisme d'inhibition exercé par les proanthocyanidines, est déterminé à partir de la représentation de *Lineweaver Burk* « $1/V_i = f(1/[S])$ » de la cinétique enzymatique en absence et en présence de l'inhibiteur (Fig. 16).

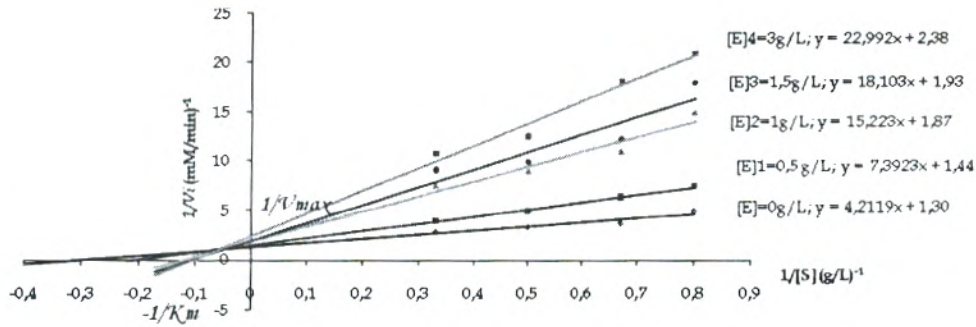


Figure 16 : Représentation de *Lineweaver Burk* en absence et en présence des proanthocyanidines de *P. granatum*, (AE=1.3 UI/mL).

A partir des courbes représentées sur la figure 16, nous pouvons calculer les vitesses maximales obtenues en présence de différentes concentrations des proanthocyanidines ainsi que les constantes de Michaelis (Tabl. 11).

Tableau 11: Les vitesses maximales et les constantes de Michaelis obtenues en absence et en présence des proanthocyanidines

[Proanthocyan.] (g/L)	0	0.5	1	1.5	2
v_{max} (mM/min)	0.77	0.69	0.53	0.51	0.42
K_m (g/L)	3.33	5	7.14	8.33	10

En se basant sur les résultats du tableau précédent, on note que la vitesse maximale de la réaction enzymatique diminue quand la concentration des proanthocyanidines augmente dans le milieu réactionnel, ainsi que la constante de Michaelis (K_m). Les deux paramètres cinétiques de l' α -amylase sont ainsi modifiés en présence de l'extrait étudié. De ce fait, la représentation de *Lineweaver Burk* (Fig. 16) révèle que le mécanisme par lequel les proanthocyanidines exercent une inhibition est un mécanisme *non compétitif mixte*.

5.3.3. Détermination des pourcentages d'inhibition et l'IC₅₀

Les pourcentages d'inhibition des proanthocyanidines, sont calculés à une concentration de substrat fixée à 3 g/L par rapport à la vitesse initiale en absence d'inhibiteur (Tabl. 12).

La concentration inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique de l' α -amylase (IC₅₀) est déterminée graphiquement en utilisant la régression logarithmique des pourcentages d'inhibition ($y=32.49\ln(x)+55.05$; $R^2=0.92$) représentée sur la Figure 17.

Tableau 12 : Les pourcentages d'inhibition des proanthocyanidines calculés à une concentration de substrat de 3 g/L (AE=1.3 UI/ml)

[Proanthocyan.] (g/L)	0	0.5	1	1.5	2
V_i (mM/min)	0.35	0.25	0.13	0.11	0.093
% d'inhibition	0	28.57	62.85	68.57	73.42

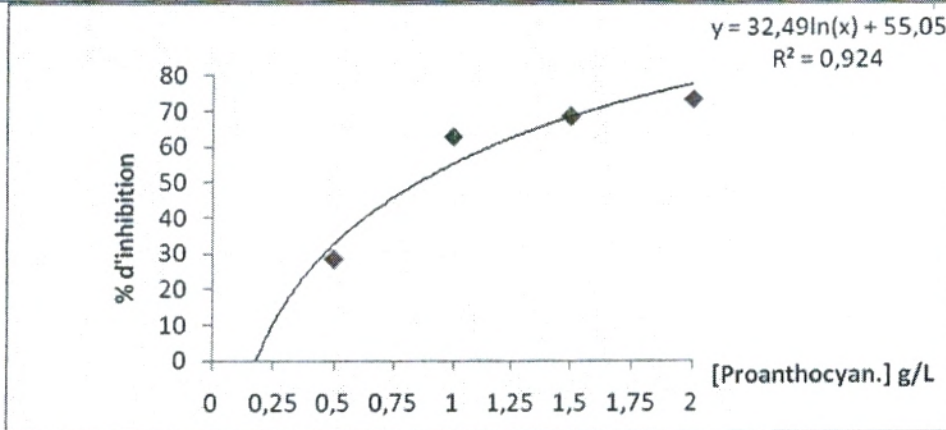


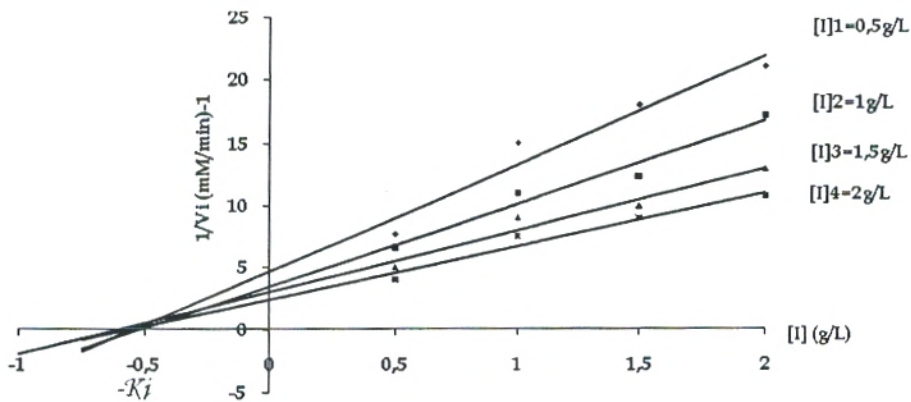
Figure 17: Courbe logarithmique des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des proanthocyanidines de *P. granatum*

$$IC_{50} = 0.85 \text{ g/L}$$

5.3.4. Détermination de la constante d'inhibition (Ki)

La constante d'inhibition (Ki) représente la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés.

Afin de déterminer cette constante, nous avons utilisé la représentation de Dixon « $1/V_i = f [I]$ » (Fig. 18).



Figure

18: Représentation de Dixon : $1/V_i = f [I]$

$$K_i = 0.5 \text{ g/L}$$

Discussion

Actuellement, la recherche de nouveaux agents antidiabétiques à partir des plantes, est centrée sur la validation expérimentale des propriétés curatives traditionnellement attribuées.

Punica granatum, l'une des principales plantes utilisées traditionnellement pour le traitement du diabète sucré à travers le monde. La richesse de cette plante en métabolites secondaires, nous a incités de vérifier l'activité d'une classe de ces métabolites qui s'appelle les proanthocyanidines ou tanins condensés, qui constituent la grande partie de la classe des polyphénols.

* Le dosage des polyphénols au niveau de notre extrait, révèle que cette plante est très riche en ces composés.

D'après Vidal *et al.* (2003), l'extrait de fruit entier de *P. granatum* est très riche en composés phénoliques et que la teneur de ces composés atteint un pourcentage de 42% d'après Chidambara Murthy (2002).

Afaq *et al.* (2005), ont montré que le fruit de grenadier est très riche en composés phénoliques tels que, les anthocyanes ainsi que les tanins hydrolysables (punicaline, acide ellagique).

De même, les travaux d'Aslam *et al.* (2006), montrent que la majorité des constituants chimiques de l'extrait aqueux de l'épicarpe de *P. granatum* appartiennent à la famille des polyphénols (punicalagine, punicaline, acide ellagique, acide gallique, quercétine, kaempferol).

Par ailleurs, Kaur *et al.* (2006), ont obtenu une valeur de 321 mg GAE/g des polyphénols au niveau des fleurs de grenadier.

* Le diabète est une maladie qui s'accompagne aussi d'un stress oxydant, qui correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire, induite soit par production excessive des radicaux libres, soit par diminution de la capacité de défense antioxydante (Opara *et al.*, 1999).

Le mécanisme de défense contre la production de ces radicaux libres est la présence des agents antioxydants comme les enzymes, les vitamines, les protéines... (Pincemail *et al.*, 2002).

D'autres composés d'origine végétale, occupent une place prépondérants dans le système de défense antioxydant, ils regroupent les composés polyphénolique tels que les tanins, les anthocyanes, les acides phénols et les flavonoïdes (Bruneton, 1993).

Actuellement, une grande diversité des méthodes analytiques pour la détermination de la capacité antioxydante est disponible. La puissance de réduction du fer est l'une de ces méthodes. La présence des réductants dans un milieu donné cause la réduction du complexe

Fe³⁺ ferricyanide à la forme Fe²⁺. En effet, la formation de Fe²⁺ peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la densité de la couleur bleue du complexe ferreux du milieu réactionnel à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance signifie une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé (Karagözler *et al.*, 2008) (Ozturk *et al.*, 2007).

Le résultat obtenu dans cette étude, a montré que notre extrait présente une activité très puissante pour réduire le fer, ce qui indique que notre extrait a un pouvoir remarquable pour donner des électrons aux radicaux libres réactifs (ou espèces réactives), les convertissant en espèces non-réactives plus stables.

Cette capacité réductrice des proanthocyanidines de l'épicarpe de *P. granatum*, peut servir comme indicateur significatif d'une activité antioxydante potentielle.

Les travaux d'Afaq *et al.* (2005), ont montré que 92% des composés phénoliques de fruits de grenadier tels que, les anthocyanes et les tanins hydrolysables, ont une activité antioxydante. De même, il a été démontré que les composés phénoliques de *P. granatum* ont une activité antioxydante *in vivo* et *in vitro* (Chidambara Murthy *et al.*, 2002 ; Noda *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2005) et que cette activité est due essentiellement à la présence de ces composés dans différents extraits des différentes parties de cette plante (Seeram *et al.*, 2005).

De même, les travaux de Ricci *et al.* (2006), ont montré que l'extrait brut d'acétate d'éthyle de l'épicarpe de *P. granatum*, présente un pouvoir antioxydant très puissant vis-à-vis du radical DPPH avec une IC₅₀ de 8.5 mg/mL.

* Les résultats obtenus lors des tests biologiques *in vivo*, montrent, que les proanthocyanidines de l'épicarpe de *P. granatum*, administrés par voie orale à une dose de 400 mg/kg p.c., provoquent un ralentissement de l'absorption intestinale des glucides. Cet effet est expliqué par l'apparition d'une hyperglycémie dans un temps prolongé (t₆₀, t₁₂₀ min) par rapport à celle des témoins où elle apparaît avec un seuil maximal et avec un taux plus important à la 30^{ème} min qui suit l'administration d'amidon ou de saccharose. Ce résultat, nous a permis de suggérer que notre extrait provoque une inhibition au niveau intestinale des enzymes responsables de l'hydrolyse d'amidon et de saccharose.

Ces glucides sont clivés au niveau intestinal en di- et monosaccharides sous l'action des enzymes digestives responsables de l'hydrolyse des hydrates de carbone : l' α -amylase et l' α -glucosidases respectivement. Cette hydrolyse qui entraîne la libération de glucose, provoque une hyperglycémie dite postprandiale, état qui joue un rôle dans le développement du diabète de type 2 et de ces complications (micro et macrovasculaire) (Lebovitz, 1997 ; Baron., 1998). Le contrôle de l'hyperglycémie postprandiale, est important pour prévenir la maladie diabétique et ces complications (Inzucchi, 2002). Cette prévention consiste à diminuer

l'absorption intestinale des glucides par l'inhibition des enzymes citées précédemment et par conséquent un ralentissement de l'absorption de glucose au niveau intestinal (Rhabasa et Chiasson, 2004).

L'agent antidiabétique oral connu pour cette action est l'acarbose, utilisé dans cette étude comme molécule de référence, est un pseudo-tétraccharide d'origine microbienne dont l'homologie structurale avec les di- et les tétraccharides alimentaires explique la liaison aux α -glucosidases de la bordure en brosse des entérocytes. Leur efficacité tient à la forte affinité de cette liaison, de ce fait, il exerce un retard dose-dépendant de la digestion de ces glucides par ralentissement de la libération de glucose dans la circulation sanguine après un repas (Bailey, 2003; Larger, 1997 ; Reuser et Wisselaar, 1994 ; Wens *et al.*, 2007).

Ainsi, l'acarbose est l'un des principaux inhibiteurs de l' α -amylase d'après Qian *et al.*, (1994) et Wong et Robertson (2003).

Donc, nous pouvons suggérer que notre extrait provoque une action inhibitrice vis-à-vis des deux enzymes (α -amylase et α -glucosidases) au niveau intestinal.

L'une de ces actions, à été confirmée dans notre étude *in vitro* sur l'activité de l' α -amylase, et qui montre que les proanthocyanidines de l'épicarpe de *P. granatum*, exercent une activité inhibitrice très puissante vis-à-vis de cette enzyme avec une IC_{50} de 0.85 g/L et une constante d'inhibition de 0.5 g/L. Cette activité confirme les tests réalisés *in vivo* sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale.

L'approche thérapeutique du diabète sucré, qui consiste à inhiber les enzymes digestives dans le but de diminuer l'hyperglycémie postprandiale, fait l'objet de plusieurs travaux, parmi lesquels les travaux de Nogueira et Pereira, (1986), qui montrent que le ralentissement de l'absorption de glucose au niveau intestinal (réduction de l'hyperglycémie postprandiale) est dû essentiellement à l'inhibition de l' α -amylase après une étude réalisée sur l'extrait brut de l'épicarpe de *P. granatum*. Cette activité inhibitrice a été aussi démontrée par Prashanth *et al.* (2001), qui ont montré que l'extrait éthanolique de l'épicarpe de *P. granatum* à une concentration de 1 mg/mL dans le milieu réactionnel exerce un effet inhibiteur vis-à-vis de l' α -amylase avec un pourcentage d'inhibition de 68.2% dans une étude qui s'intéresse aux plantes antidiabétiques.

Les travaux de Li *et al.* (2005), ont montré que l'extrait méthanolique des fleurs de *P. granatum* administré par voie orale à différentes doses (250, 500 et 1000 mg/kg p.c.) provoque une diminution de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (saccharose 1 g/kg p.c.) avec un pourcentage de 13.9%, 19.7% et 20.6% respectivement chez les souris normales.

Ces résultats sont expliqués par le ralentissement de l'absorption intestinale de glucose par l'inhibition des α -glucosidases *in vitro* avec une IC_{50} de 1.8 $\mu\text{g/mL}$.

De même, les travaux de Layer *et al.* (1986), qui ont testé six plantes médicinales indiennes, parmi eux *P. granatum*, et ont montré que ces plantes possèdent une activité inhibitrice très puissante vis-à-vis de l' α -amylase, potentiellement utiles dans le contrôle de l'obésité et le diabète sucré.

Kashket *et al.* (1988), montrent que l'activité α -amylasique est inhibée à 50% par les tanins du thé. Ainsi que Kandra *et al.* (2004), ont trouvé qu'un acide tannique de commerce exerce une activité inhibitrice non compétitive mixte vis-à-vis de l' α -amylase humaine d'origine salivaire.

Les différents effets exercés par les proanthocyanidines de *P. granatum*, trouvés dans cette étude, expliquent bien son usage en médecine traditionnelle dans le traitement du diabète sucré et ces complications à travers le monde.

Conclusion et perspectives

Ce travail, nous a amené à déduire, d'après les résultats obtenus, que les proanthocyanidines de l'épicarpe de *P. granatum*, ont une activité très puissante pour réduire le fer, comparable avec celle de l'acide ascorbique d'une part. D'autre part, ces composés provoquent un ralentissement de l'absorption intestinale de glucose. Cette action est expliquée par l'inhibition des enzymes digestives responsable de l'hydrolyse des di- et polysaccharides (α -glucosidases et α -amylase respectivement) et par conséquence une diminution de l'hyperglycémie postprandiale.

Au-delà de ces résultats, il est souhaitable de compléter et d'approfondir ce travail par :

- ✘ Une étude de l'activité antioxydante vis-à-vis d'autres radicaux libres (DPPH...) complétée par une étude *in vivo* ;
- ✘ Une étude *in vivo* chez les rats rendus diabétiques ;
- ✘ Une étude *in vitro* qui confirme l'inhibition vis-à-vis des α -glucosidases ;

Il serait aussi intéressant de tester ces composés vis-à-vis d'autres cibles physiologiques, afin d'évaluer autres mécanismes d'action :

- ✘ Captation de glucose au niveau périphérique (foie, muscle, tissu adipeux) ;
- ✘ Stimulation de la sécrétion d'insuline ;
- ✘ Diminution de l'insulinorésistance au niveau des cellules cibles.

Références bibliographiques

- [1]. "ADA" American Diabetes Association, 2005. Workgroup on hypoglycaemia Defining and Reporting hypoglycaemia in diabetes. *Diabetes Care*, 28: 1245-9.
- [2]. Afaq F., Saleem M., Krueger C.G., Reed J.D., Mukhtar H., 2005. Anthocyanin- and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulate MAPK and NF-Kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International Journal of Cancer*, 113: 423-433.
- [3]. Alberti K G et Zimmet P Z (for the WHO Consultation), 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. *Diabetic Medicine*; 15: 539-553.
- [4]. Anaes (l'Agence National d'Accréditation et d'Evaluation en Santé), 2000. and therapeutic use in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Drugs*; 49: 721-749.
- [5]. Aslam M.N., Lansky E.P., Varani J., 2006. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote prolifération and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *Journal of ethnopharmacology*, 103: 311-318.
- [6]. Aviram M., Dornfeld L., 2003. Methods of using pomegranate extract causing regression in lesions due to arteriosclerosis in humans. *US Patent*, 6. 641-850.
- [7]. Bagri P., Ali M., Aeri V., Bhowmik M., Sultana S. 2008. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: effect on hyperlipidemia pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and Chemical Toxicology*. S0278-6915 (08) 00555-3.
- [8]. Bailey C.J., 2003. New approches to the pharmacotherapy of diabetes (3rd ed.) In Pickup J.C., and William G., Editors, *Textbook of diabetes*, Vol. 2, Blackwell Science Ltd., UK., 73.1-73.21.
- [9]. Barcelo A., 1996. Série de monographie sur les maladies liées au vieillissement : Diabète sucré non insulino-dépendant (DNID). Vol. 17 N°1.
- [10]. Baron A.D., 1998. Post prandial hyperglycemia and α -glucosidases inhibitors. *Diabetes. Research and Chemical Practica* 40, 55; s.55.
- [11]. Baxter AG., Duckworth RC., 2004. Model of type I (autoimmune) diabète, *Drug Discov Today: Disease Model*. 1:451-455.
- [12]. Baynes JW., 1992. Perspectives in diabète. Rôle of oxidative stress in development of complications in diabète. *Diabète*. 40: 405-11.
- [13]. Benmehdi H., 2000. Valorisation des plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Thèse de Magister. *Chimie organique appliquée*. Université Abou Bekr Belkaïd –Tlemcen-.
- [14]. Bernfeld P., 1955. Amylase, α and β , in *Methods in Enzymology*. (Colowick S. and Kaplan N.O. eds.), *Academic Press*, New York. Vol. 1: 149-158.
- [15]. Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A et Ziyat A., 2002. Ethnopharmacology Forum Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int J Diabetes & Metabolism* ; 10 : 33-50.
- [16]. Bnouham M, Ziyat A, Mekhfi H, Tahri A et Legssyer A., 2006. Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *Int J Diabetes & Metabolism*; 14: 1-25.

- [17]. Boizot, N., Charpentier, J.P., 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques, Le Cahier des Techniques de l'Inra, 79-82.
- [18]. Braga L.C., Schupp J.S., Chartone-Souza E., Nasciomento A.M.A., 2005. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 335-339.
- [19]. Bridel F., Bailly C., Dion N., Patiny A., Guimarães O., Geirnaert E., 2004. Guide visual des espèces. ABCorpus. GNU F.D.L. 85.
- [20]. Brun JM, Cathelineau G, Charbonnel B et al., 1995. Recommandations de l'ALFEDIAM. Mise à l'insuline du diabétique non-insulino-dépendant (diabétique de type 2). *Diabète et métabolisme* (Paris); 21 : 291-294.
- [21]. Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 2^{me} édition, Paris: Editions médicales internationales, *Tec & Doc Lavoisier*, p 1120.
- [22]. Bruneton, J., 1993. Pharmacognosie et Phytochimie. Plantes médicinales, *Tec et Doc Paris*, 278-279.
- [23]. Calzada F., Yépez-Mulia L., Aguilar A., 2006. *In Vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Girardia lamblia* to plant used in Mexican tradicional medecine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 367-370.
- [24]. Capet F, Debaillie R, Tafforeau J et Van Oyen H., 1999. Situation Actuelle et Eléments pour le Développement d'une Politique de Santé : diabète épidémiologie. *CROSP* ; 19 : 1-12 ; 27-28.
- [25]. Charbonnel B., et Cariou B., 1997. Diabète non insulino-dépendant: indications thérapeutiques. *Medecine thérapeutique*; 3 hs: 103-11.
- [26]. Chavan U-D., Shahidi F., Nacz M., 2001. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by différent solvents. *Food Chemistry*, 75:509-512.
- [27]. Chidambara Murthy K.N., Jayaprakasha G.K., Singh R. P., 2002. Studies on Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) Peel extract using in vivo models. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 4791-4795.
- [28]. Chung K-t et Wei C-I., 2001. Are tannins a double edged sword in biology and health?. *Trends in Food Science et Technology*, 9:168-115.
- [29]. Curry S.C., 2004. Breast enhancement system. *U.S. Patent*, 6: 673-366.
- [30]. Curtin JF., Donovan M., Cotter TG., 2002. Régulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods*. 265 : 49-72.
- [31]. Das A.K., Mandal S.C., Banerjee S.K., Sinha S., Das J., Saha B.P., Pal M., 1999. Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. *Journal of Ethnopharmacolog*, 68: 205-208.
- [32]. Das A.K., Mandal S.C., Benerjee S.K., Sinha S., Saha B.P., Pal M., 2001. Studies on the hypoglycemic activity of *Punica granatum* seed in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytothe. Res.*, 15 (7): 628-9.

- [33]. De Broucker H., 1986. Problemes Quotidiens du diabete ; Si l'obese devient diabetique ; n°200.
- [34]. De Bruyne T., Pieters ., Deelstra H., Vlietink A., 1999. Condensed vegetable tannins :Biodiversity and biological activities .*Biochemical Systematics and Ecology*,27:445-459.
- [35]. Decaux I., 2002. phytotherapie :mode d'emploi,Ed :le bien public,6-7.
- [36]. Domart A et Bourneuf J., 1986. Nouveau Larousse Médical. Paris ; n°13515 : 320-22
- [37]. Drouin P., Blickle J.F., Charbonnel B., Eschwege E., Guillausseau P.J., Daninos J.M., Balarac N. et Sauvanet J.P., 1999. Diagnostic et classification du diabète sucré. Les nouveaux critères. *Diabète et Métabolisme*. Paris, 25 (1): 72-83.
- [38]. Dunn C J et Peters D; 1995. Metformin. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Drugs* ; 49 : 721-749.
- [39]. Duron F., Heurtier A., 2006. Epidémiologie, clinique et traitement des diabètes. *Endocrinologie. DCEM1. Examen National Classant 2006-2007. Université Paris VI*, 232: 239-299.
- [40]. Eddouks M., Maghjrani M., Lemhadri A., Ouahidi M.L., Jouad H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac in the south-east region of Morocco (Talilafet). *Journal of Ethnopharmacology*, 82 (2-3): 97-103.
- [41]. Eddouks,M ; Ouahidi, M.L ; Farid,O ; Moufid, A ; Khalidi, A ; Lemhadri, A., 2007. L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc..5:194-203.
- [42]. Evans JL., Goldfine., Maddux BA., Grodskygm., 2003.Are oxidative stress aactivated signalhng pathways mediators of insulin résistance and b-cell dysfunction? *Diabètes*. 52 : 1-8.
- [43]. Filippi C., Von Herrath M., 2005. How viral infections affect the autoimmune process ding to typeI diabètes. *Cell Immunol*. 233(2) : 125-132.
- [44]. Furukawa S., Fujita T., Shimabukura M., Wakl M., Yamada Y., Makajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimura i., 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact metabolic syndrome *J. Clin. Invest*.114 (12) :1752-1761.
- [45]. Ghestem A., Seguin E ., Paris M., Orecchioni A-M., 2001.Le préparateur en pharmacie .Dossier 2.Editions TEC & DOC Paris.275p.
- [46]. Gil M.I., Tomas-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M., Kader A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4581-4589.
- [47]. Gin H et Rigalleau V., 1999. Dietitique et Diabetes. *Encycl Med Chir (E.M.C) ; Elsevier, Paris ; Endocrinologie- Nutrition 10-366-R-10.*
- [48]. Girard J., 1999. Fondements physiopathologiques du diabète de type 2. *La revue du praticien*, 49: 22-29.
- [49]. Grimaldi A., 1999. Diabétologie. Questions d'internat. CHU-Ps ; 15-253 :99-129.

- [50]. Grimaldi, A; Sachons; Busquet, F., 1995. LES diabètes comprendre pour traiter : Edition international.
- [51]. Harbone J.B., 1998. Phytochemistry Analysis ,Ed Thomson Sci. London.
- [52]. Hansen LL., Ikeda Y., Olsen GS et al., 1999. Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H₂O₂. *JBiol Chem.* 274 : 25078-25084.
- [53]. Holgrem A., 2003. Redox régulation of gènes and cell function. In: Critical review of oxidative stress and aging. Eds. *World Scientific.* 2 : 102-111.
- [54]. Hubert, J., 2006. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, spécialité : Qualité et sécurité des aliments, p 174.
- [55]. Inzucchi S.E, 2002. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes. Scientific review. *J. Am. Med. Assoc.*, 287: 360-72.
- [56]. Joël P, Jean OD, Raymond L., 2001. Vitamines, acides gras et prévention de maladies cardiovasculaires. *Medi Sphère* 13 : 1-3.
- [57]. Jouad H, Haloui M, Rhiouni H, El Hilaly J et Eddouks M., 2001. Ethnobotanical survey of medicinal used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North center region of Morocco (Fez- boulemane). *Journal of Ethnopharmacology*; 77: 175-182.
- [58]. Kandra L., Gyémant G., Zajàcz Á., Batta G., 2004. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319: 1265-1271.
- [59]. Karagözler, A.A., Erdag, B., Emek, Y.G., Uygum, D.A., 2008. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*, *Food Chemistry*, 111, 400-407.
- [60]. Kashket *et al.*, 1988. Inhibition of salivary amylase by water soluble extract of tea. *Arch oral Biol.*, 33- 845-846.
- [61]. Kaur G., Jabnbar Z., Athar M., Alam M.S., 2006. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract processes potent antioxidant activity and abrogates FE-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and chemical toxicology*, 44: 984-993.
- [62]. Kawamada Y., Shimada T., 2002. Cosmetic or tropical composition containing *Punica granatum* extracts. Japon Kokai Tokkyo Koho, *Japanese Patent*: JP 2002234814 A2 20020823.
- [63]. Khanbaba K et Ree T.R., 2001. Tannins:Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry*, 18:641-649.
- [64]. Kim Y.M., Wang M.H., Rhee H., 2004. A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydrate Research*, 339: 715-717.
- [65]. Kreider M, Gerich J et Wittlin S., 1997. Bedtime insulin in non-insulin dependent diabetes mellitus: rationale, safety, efficacy and recommendations. *Diabetes Nutr Metab Clin Exp*; 10: 82-93.
- [66]. Lansky E.P., 2000. Pomegranate supplements prepared from pomegranate material including

pomegranate seeds. *U.S. Patent*, 6: 060-063.

[67]. Lansky E.P., Newman R.A., 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 177-206.

[68]. Langer E ; 1998. Mécanismes d'action des antidiabétiques oraux. *Médecine Thérapeutique*, Paris ; Hors Série: 97- 102.

[69]. Langer E., 1997. Mécanisme d'action des antidiabétiques oraux. *Médecine thérapeutique*, Paris ; Hors Série : 97-102.

[70]. Laver P., Rizza Ra., Zinsmeister A.R., Carlson G.L., Dimagno E.P., 1986. *Mayoclin Proc*; 61:442.

[71]. Lebovitz H.E., 1997. Alpha- glucosidase inhibitors. *Endocrinol. M et ab. Chin. North s.* 26, 539-551.

[72]. Ledoux S., 1997. Le diabète insulino-dépendant. *Endocrinologie et Nutrition*. Ed. Vigot. 251-255.

[73]. Lee J., Watson R.R., 1998. Pomegranate: a role in Health and promotion and AIDS? In: Watson RR. (Ed.), *Nutrients and Foods in AIDS*. CRC Press. Boca Raton, FL. pp: 179-172.

[74]. Lerverve X., 2004. Stress oxydant en réanimation: quelle place pour les antioxydants? *Elsevier SAS* : 295-302.

[75]. Li Y., Wens S., Kota P.B., Peng G., Li G.Q., Yamahara J., Roufogalis B.D., 2005. *Punica granatum* flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic Fatty rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 239-244.

[76]. Maoyadi A., 2004. Mixtures of pomegranate seed oils for cosmetics. *Japanese Patent: JP* 2004083544 A2 20040318.

[77]. Marles R J et Farnsworth N., 1996. antidiabetic plants and their active constituent. *Prot. J Bot Med* ; 1 (3) : 85-135.

[78]. Monnier L et Avignon A., 1997. Nutrition et diététique du diabète non insulino-dépendant. *Médecine thérapeutique*; 3 : 87-96.

[79]. Monnier L, Slama G, Vialettes B et Ziegler O., 1995. Nutrition et diabète. Recommandations de l'ALFEDIAM. *Diabetes Metab* ; 21:207-16.

[80]. Moore H., Summerbell C., Hooper L., Cruickshank K., Vyas A., Johnstone P., Ashton V., Kopelman P., 2004. Dietary advice for treatment of type 2 diabetes mellitus in adults. *The Cochrane database of Systemic Reviews Issue 2*, Art. N°. CD004097. pub. 2.

[81]. Morrow JD., 2003. Is oxidant stress a connection between obesity and atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc.Biol.* 23(3) :368-370.

[82]. Negi S. et Baner J., 2006. Amylase and protease production from *Aspergillus awamori*. *Food Techol. Biotechnology*, 44 (2): 257-261.

[83]. Nicholson JP., Wolmarans MR., Park GR., 2002. The rôle of albumin in critical illness. *Br J Anaesth*, 85 : 599-610.

- [84]. Noda Y., Kaneyuka T., Mori A., Packer L., 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 166–171.
- [85]. Nogueira D.G., Pereira N.A., 1986. Inhibitory action of intestinal absorption of glucose of the epicarpe of roma (*Punica granatum* L.) Rev. Bras. Farm. 67,129.
- [86]. Okuda T., 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66:2012-2031.
- [87]. OMS (Organisation mondiale de la santé), 2002a. Diabète sucré. Aide mémoire N° 138.
- [88]. OMS (Organisation mondiale de la santé), 1999. Definition, Diagnostic and Classification of Diabetes Mellitus and its complications. Report of a WHO consultation, Part 1: *Diagnostic and classification of Diabetes Mellitus*. 1-49.
- [89]. OMS (Organisation mondiale de la santé), 2002b. Fact Sheet N°. 271. Geneva.
- [90]. OMS (Organisation mondiale de la santé), 2006. Le diabète: aide-mémoire n 3/2 Septembre.
- [91]. OMS (Organisation mondiale de la santé), 2007. bureau régional de l'Afrique ; Prévention et control du diabète une stratégie pour la région African de l'OMS : 1-43.
- [92]. OMS et FID (Organisation Mondiale de la Santé, fédération Internationale du Diabète), 2004. Communiqués de presse 2004 : il faut agir contre le diabète. Genève.
- [93]. Opara E.C., Abdel-Rahman E., Soliman S., 1999. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism*, 48 : 1414-1417.
- [94]. Ortiz-Andrade R.R.V., Rodriguez-Lopez M.L., Garduño-Ramirez P., Castillo-España S., Estrada-Soto, 2005. Anti-diabetic effect on alloxinized and normoglycemic rats and some pharmacological evaluations of *Tournefortia hartwegiana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 101: 37-42.
- [95]. Owuor ED., Kong AN., 2002. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol*. 1 (64):765-770.
- [96]. Ozturk, M., Aydogmus-Ozturk, F., Duru, M.E., Topçu, G., 2007. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant, *Food Chemistry*, 103, 623-630.
- [97]. Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., Zhang, J., Huang, F., 2008. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel, *Food Chemistry*, 106: 1264-1270.
- [98]. Peronny S., 2005. La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta). Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie .151p.
- [99]. Perret C., 2001. Analysis de tannins inhibiteurs de stilbène oxydase produite par *Brytis cinerea* Pers.:FR .Thèse de Doctorat .Université de Neuchatel.173p.
- [100]. Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O., 2002. Physiological action of antioxidant defences, *Nutrition clinique et métabolisme*, 16, 233–239.
- [101]. Prashanth D., Asha M.K., Amit A., 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*,

72: 171-173.

- [102]. Prashanth D., Padmaja R., Samiulla D.S., 2001. Effect of certain plant extracts on α -amylase activity. *Fitoterapia*, 72: 179-181.
- [103]. Qian M., Haser R., Buisson G., Duee E., Payan F., 1994. The active center of a mammalian α -amylase structure of the complex of pancreatic α -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-Å resolution. *Biochemistry*, 33: 6284-6294.
- [104]. Quezel P., Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition : Centre National de la Recherche Scientifique. Paris 7. 1170p
- [105]. Reuser A. et Wisselaar H., 1994. An evaluation of potential side-effects of alpha glucosidases inhibitors used for the management of diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.*, 24 (suppl 3): 19-24.
- [106]. Rhabasa-Lhoret R., et Chiasson J.L., 2004. Alpha glucosidase inhibitors (3rd ed.). In R. A. Defronzo, E. Ferrannini, H. Keen, and P., Zimmet (Eds). *International textbooks of diabetes mellitus* (Vol. 1). UK: John Wiley.
- [107]. Ricci D., Giamperi L., Bucchini A., Fraternali D., 2006. Antioxydant activity of *Punica granatum* fruits. *Fitoterapia*, 77: 310-312.
- [108]. Robertson RP., 2004. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet B-cells in diabète *J Biol Chem*, 279: 42351-42354.
- [109]. Rodier M., 2001. Définition et classification du diabète. *Médecine nucléaire-Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 25 (2): 91-93.
- [110]. Rosenblat M., Hayek T., Aviram M., 2006. Antioxidative effects of pomegranate juice consumption by diabetic patients on serum and on macrophage. *Atherosclerosis*, 187: 363-371.
- [111]. Roucky., 2001. Le traitement phytonutritionnel du diabète Nutraneus. 21 :09-01.
- [112]. Rout S., Banerjee R., 2007. Free radical scavenging, antiglycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from *Punica granatum*. *Bioresource Technology*, 98: 3159-3163.
- [113]. Rudich A., Tirosh A., Potashnik R., 1999. Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*. 42 : 949-957.
- [114]. Rutten G, Nijpels G., Goudswaard AN., Heine RJ., Bouma M., 2006. NHG-Standaard Diabète mellitus type 2. *Huisarts Wet.* 49 : 137-152.
- [115]. Schubert S.Y., Lansky E.P., Neeman I., 1999. Antioxidant and eicosanoïd enzym inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoïds. *Journal of Ethnopharmacology*, 66: 11-17.
- [116]. Seeram N.P., Adams L.S., Henning S.M., Niu Y., Zhang Y., Nair M.G., Heber D., 2005. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total

- pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 360-367.
- [117]. Sepa A, Wahlbergj. Vaarala O, Frodi A, Ludvigsson J., 2005. Psychological stress may induce diabetes-related autoimmunity in infancy. *Diabetes Care*. 28(2) :290-295.
- [118]. Shiraishi T., Abe M., Miyagawa T., 2002. Cheese foods containing conjugated polyunsaturated fatty acid glycerids. *Japanese Patent*, JP: 2002176913.
- [119]. Stangeland T., Remberg S. F., Lye K. A., 2009. Total antioxidant activity in 35 Ugandan fruits and vegetables. *Food and Chemistry*, 113: 85-91.
- [120]. Surveswaran S., Cai Y.Z., Corke H., Sun M., 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102: 938-953.
- [121]. Syed D.N., Afaq F., Mukhtar H., 2007. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminar in Cancer Biology*, 17: 377-385.
- [122]. Tahraoui A., EL-Hilaly J., Israili Z.H., Lyoussi B., 2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 105-117.
- [123]. The expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus., 1997. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* ; 20: 1183-1197.
- [124]. Tournaire J., 1994. Endocrinologie. Diabète Nutrition pour le praticien. Ed. Masson SIMEP; 1^{ère} Ed.: 317-319.
- [125]. Vermerris, W., Nicholson, R., 2006. Isolation and Identification of Phenolic Compounds, Phenolic Compound Biochemistry, Published by Springer, Dordrecht, 35-62-151-191.
- [126]. Vidal A., Fallarero A., Peña B.R., Medina M.E., Gra B., Rivera F., Gutierrez Y., Vuorela P.M., 2003. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 89: 295-300.
- [127]. Voravuthikunchai S.P., Limsuwan S., Mitchell H., 2006. Effect of *Punica granatum* pericarp and *Quercus infectoria* Nutgalls on Cell surface hydrophobicity and cell survival *Helicobacter pylori*. *Journal of Health science*, 52 (2): 154-159.
- [128]. Waeber G., 2000. Diabétologie expérimentale. *Revue médicale de la Suisse Romande*, 120 : 907-913.
- [129]. Wens J., Sunaert P., Nobels F., Feyen L., Crombruggen P.V., Bastiaens H., Royen P. V., 2007. Diabète sucré de type 2. Recommandation de bonne pratique. *Société Scientifique de Médecine Générale (SSMG)*, 02: 3-72.
- [130]. Wikipédia « Encyclopédie libre », 2010. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Grenadier>
- [131]. Wong D., et Robertson G., 2003. α -Amylases. *U.S. Department of Agriculture, Albany, California, U.S.A.* 56.
- [132]. Zimmer N et Cordesse R., 1996. Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des

ruminants Ed INRA Prod Anim, 9 :167-179.

[133]. Zimmet P., Alberti K., Shaw J., 2001. Global and social implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414: 782-787.

[134]. 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.

Résumé

Le travail est réalisé dans le cadre d'évaluer les propriétés antioxydant et l'influence des proanthocyanidines extraites a partie de l'épicarpe de *punica granatum* sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale(HGPO) ainsi que l'activité inhibitrice vis-à-vis de l' α amylase.

Le pouvoir antioxydant de notre extrait est évalué par la méthode de FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*), et le résultat obtenu montre une activité très puissante pour réduire le fer, similaire avec celle de l'acide ascorbique utilisé comme molécule de référence.

L'influence des proanthocyanidine sur l'hyperglycémie provoqué par voie orale, a une dose de 400mg/kg p.c chez les rats normaux, montre que cet extrait provoque un ralentissement de l'absorption intestinale de glucose libéré après hydrolyse enzymatique de saccharose et d'amidon.

Cette action est expliquée par l'inhibition des enzymes digestifs responsable de l'hydrolyse des hydrates de carbonnes (α -glucosidase et α -amylase) avec un IC_{50} de 0.85g/L et un K_i de 0.5g/L

Mots clé : *Punica granatum*, hyperglycémie post-prandiale, diabète sucré, plantes médicinales, α -amylase, activité antioxydante, proanthocyanidines.