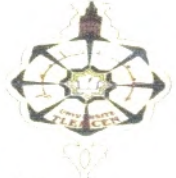


MAST-Bio-254 / 03

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abou Bakr Belkaid –Tlemcen-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie Moléculaire et cellulaire



Laboratoire :

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

Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Biologie

Option : Biochimie



Etude *in vitro* de l'effet de l'extrait de la *Citrullus colocynthis* sur l'activité de l' α -amylase

Présenté par : M^{me} LAOUFI Hind



Soutenu le ~~12~~ 19/07/2012 devant le jury

Président : Mr Djaziri R.

M.C, Université de Tlemcen.

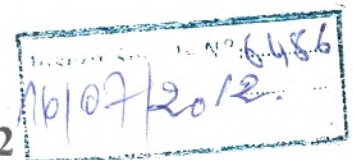
Examinatrice : M^{me} Benmansour M.

M.A, Université de Tlemcen.

Promotrice : M^{lle} BENARIBA N.

M.A, Université de Tlemcen.

Année universitaire : 2011/2012



République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abou Bakr Belkaid –Tlemcen-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie Moléculaire et cellulaire



Laboratoire :

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

Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Biologie

Option : Biochimie

Etude *in vitro* de l'effet de l'extrait de la *Citrullus colocynthis* sur l'activité de l' α -amylase

Présenté par : M^{me} LAOUFI Hind

Soutenu le ~~19/07~~ 2012 devant le jury

Président : Mr Djaziri R.

Examinatrice : M^{me} Benmansour M.

Promotrice : M^{lle} BENARIBA N.

M.C, Université de Tlemcen.

M.A, Université de Tlemcen.

M.A, Université de Tlemcen.

Année universitaire : 2011/2012



Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu d'avoir donné à l'homme le pouvoir de raisonner, exploiter, et expliquer les vérités de l'univers.

Ma profonde reconnaissance s'adresse à Melle Benariba, Maître assistante au département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, d'avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils et ses encouragements qui m'ont permis de mener à bon ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur DJAZIRI R., Maître de conférences au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen-, d'avoir accepté de présider le juré.

Je tiens à remercier profondément Madame Benmensour, Maître assistante au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen, qui ma fait l'honneur d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimiques, Synthèse et activité biologique».

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, par un soutien moral ou matériel.



Résumé

L'objectif de notre travail est de tester *in vitro* l'effet de différents extraits du fruit entier de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*), sur l'activité de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*.

Dans ce but, le travail est initié par une extraction sélective à partir du fruit entier de la coloquinte qui aboutie à la préparation de certains extraits organiques et aqueux.

Le dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux, nous a révélé que l'extrait En-B présente le taux le plus élevé en polyphénols et flavonoïdes, il est de 47,13 μg équivalent acide gallique/mg d'extrait (μg GAE/mg) et 35.68 μg équivalent catéchine par milligramme d'extrait (μg CEq/mg) respectivement, suivie par l'extrait EA avec une concentration de 41.34 (μg GAE/mg) et de 11.95 (μg CEq/mg) respectivement. Ces résultats sont confirmés par une analyse chromatographique qui a révélé la présence de la catéchine, quercétine et myricétine

Les testes réalisés *in vitro* sur l'activité de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* montrent que tous nos extraits exercent un effet inhibiteur variable dose-dépendant, essentiellement l'extrait aqueux EA à fortes concentrations 1.676 et 2.5 mg/ml présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé il est d'environ 90 % par rapport à l'extrait EM, En-B et EAc qui assure une inhibition de 58.97 %, 52. 92 % et 47,91 % respectivement. De même à la concentration de 0.5 mg/ml l'extrait EA présente un pourcentage d'inhibition de 55.24 % de loin le plus élevé par rapport à l'extrait EM, En-B et EAc qui assure une inhibition de 8.15 %, 9.90 % et 8.31 % respectivement.

En fonction de ces résultats on suggère que nos extraits peuvent exercer un effet inhibiteur *in vivo* sur l'absorption intestinale des glucides en inhibant l' α -amylase

Mots clé : *Citrullus colocynthis*, α -amylase, polyphénols, flavonoïdes, inhibition, activité d' α -amylase.

Liste des abréviations

ADA : American Diabetes Association.

DID: diabète insulino-dépendant.

DNID : diabète non insulino-dépendant.

HbA1c : hémoglobine glyquée.

HGPO : hyperglycémie provoquée par voie orale.

IDF: International Diabetes Federation.

I.P : intrapéritonéale.

K_{ATP} : potassium ATP dépendant.

OMS : Organisation Mondiale de la santé.

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ .

SUR : sous-unité récepteur du canal K_{ATP}.

CCM : chromatographie sur couche mince.

E.D : eau distillée.

MeOH : méthanol.

EA : extrait aqueux.

EM : extrait hydro-méthanolique.

EH : extrait d'hexane.

EAc : extrait acétate d'éthyle.

En-B : extrait n butanol.

DO_A : densité optique ou absorbance des tests sans extrait.

DO_B : densité optique ou absorbance des tests avec l'extrait.

R_f : rapport frontal.

V/V : volume/volume.

Le diabète est une maladie métabolique chronique, endocrinienne, complexe insidieuse et ubiquitaire qui représente une source majeure de complications de santé à travers le monde [Drouin et al., 1999 ; Kambouche et al., 2009]. Cette maladie est caractérisée par une hyperglycémie qui résulte, d'une déficience absolue ou relative de la sécrétion en insuline (apparaît lorsque les cellules β du pancréas ne produisent pas suffisamment d'insuline), d'action d'insuline (l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit), ou les deux anomalies à la fois ; l'une des conséquences de ces anomalies est l'hyperglycémie, qui peut être permanente ou seulement postprandiale, et accompagnée ou non de glycosurie [Eddouks et al., 2007 ; ADA, 2008 ; Donga et al., 2011 ; Sales et al., 2012].

Le diabète constitue un problème majeur de santé publique [Kambouche et al., 2011] et son impact sur les systèmes de santé est très lourd, engendre de multiples problèmes, médicaux (aggravant l'invalidité et provoquant la diminution de l'espérance de vie), économiques (engendrant de forts coûts médicaux liés aux traitements) et sociaux [Belkhadir et El-Alaoui 1993 ; Eddouks et al., 2007 ; Khacheba, 2008].

Le nombre de personnes atteintes de diabète ne cesse de croître de façon très alarmante. L'OMS a tiré la sonnette d'alarme par rapport à l'évolution de cette maladie, pour prendre conscience de la gravité de la situation et d'agir avant qu'elle ne prenne des proportions incontrôlables, selon ses statistiques, ce fléau touche plus de 280 millions de personnes dans le monde et pourrait atteindre plus du double d'ici l'horizon 2030 (soit une augmentation de plus de 122 %) [Wild et al., 2004 ; Whiting et al., 2011 ; Kambouche et al., 2011]. Après qu'il a été estimé à 135 millions en 1995, 151 à 171 millions en 2000 [IDF, 2000 ; Wild et al., 2004 ; Whiting et al., 2011], 194 millions en 2003 [IDF 2003 ; Whiting et al., 2011], 246 millions entre 2006 et 2007 [IDF, 2006 ; Unwin et al., 2010 ; Whiting et al., 2011], 285 millions en 2010 (soit 6.4 %) et à 300 millions en 2025 [IDF, 2009 ; Shaw et al., 2010 ; Unwin et al., 2010 ; Whiting et al., 2011]. La Fédération internationale du diabète (FID) a déclaré que toutes les cinq secondes, une personne développe la maladie [Kambouche et al., 2009 ; OMS et IDF, 2009], dont le nombre des diabétiques adultes (20-79 ans) a révélé une augmentation de 69 % dans les pays en voie de développement et 20 % dans les pays développés [Shaw et al., 2010].

L'Algérie n'est pas épargnée par cette épidémie qui interpelle le corps de la santé pour un redéploiement des moyens tournés vers ces pathologies chroniques non transmissibles.

En Algérie, les études concernant ce fléau social sont encore peu nombreuses malgré qu'elle est classée parmi les pays d'Afrique du nord les plus touchés par cette pathologie [Malek, 2008]. La maladie continue d'augmenter d'une manière particulièrement accélérée, en particulier dans certaines régions défavorisées du pays. le nombre des diabétiques est passé d'un million de personnes en 1993, à plus de 2.5 en 2007 soit une prévalence de 7.3 % et à plus de 3 millions de personnes en 2011 soit 7.4 % de la population algérienne avec une prévision qui atteindra 8.9 % en 2025 et plus de 9,3 % en 2030 [Malek et al., 2001 ; Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, 2005 ; Malek, 2008 ; Shaw et al., 2010], devant cette situation on note une absence de laboratoires pharmaceutiques et d'associations de malades atteints du diabète pour le dépistage de cette "catastrophe sanitaire", sachant que 10 % de la population algérienne ne sait pas qu'elle est diabétique [Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, 2005 ; Eddouks et al., 2007]. Sur la population algérienne dont l'âge est compris entre 20 et 75 ans l'estimation était de 8.4 % de diabètes sucrés en 2007, dont 15.3 % au niveau de Tlemcen, 10.6 % au niveau de Ain Taya, 8.9 % à Sétif et 6.8 % à Oran [Unwin et al., 2001 ; OMS, 2005 ; Zaoui et al., 2007 ; Chibane et al., 2008 ; Malek, 2008].

Le diabète constitue une cause considérable de la mort prématurée et il occupe la quatrième place parmi les dix premières causes de décès. Selon l'OMS, toutes les 10 minutes dans le monde, une personne meurt du diabète ; D'après les estimations : 1, 1 million de personnes sont mortes du diabète en 2005 et près de 80 % des décès dus à cette maladie se produisent dans les pays à revenu faible ou moyen. En 2010, on note quatre millions de décès, ce qui représente 6.8 % (de tout âge) du totale des morts par d'autres causes, et 10 % ou plus des morts dont l'âge est compris entre 20 et 79 ans. L'OMS prévoit que les décès dus au diabète vont augmenter de plus de 50 % au cours des dix prochaines années, si l'on ne prend pas des mesures urgentes. A l'horizon 2015, ces décès risquent d'augmenter de plus de 80 % dans les pays à revenu moyen [Roglic et al., 2010 ; El Ghouli et al., 2011].

Le diagnostic de diabète peut être établi sur certains critères principalement,

- Les symptômes de diabète polyurie, polydipsie, amaigrissement inexplicable, somnolence voir coma, et une hyperglycémie $\geq 2,00$ g/l (11,1 mmol/l) quelle que soit l'heure de mesure.
- Une glycémie à jeun $\geq 1,26$ g/l (7,00 mmol/l).
- Une glycémie 2 h après une charge orale de 75 g de glucose (HGPO) $\geq 2,00$ g/l.

En absence d'une hyperglycémie évidente les résultats devront être confirmés par une deuxième mesure [Drouin et al., 1999 ; Arbouche-Lezoul, 2007 ; Noubel, 2009].

En effet, le diabète se manifeste sous deux principales différentes formes (les autres formes sont beaucoup moins fréquentes), le diabète type 1 qui survient le plus souvent avant l'âge de 20 ans et représente 10 à 15 % des diabètes, et le diabète type 2 qui survient le plus souvent après l'âge de 50 ans et représente 85 à 90 % des diabètes [Drouin et al., 1999 ; Grimaldi, 2000].

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 dans les populations des pays industrialisés. Cette maladie n'épargne pourtant pas les pays sous développés où le diabète non insulino-dépendant atteint parfois une prévalence de 20 à 30 %, en raison d'une prédisposition génétique couplée à une modification rapide du mode de vie : urbanisation brutale, sédentarisation et alcoolisation des populations [Grimaldi, 2000].

Le diabète de type 1 (DID: diabète insulino-dépendant) est remarquable par son début brutal : syndrome cardinal associant polyuropolydipsie, polyphagie, amaigrissement et asthénie chez un sujet jeune, mince, avec cétonurie associée à la glycosurie. Il en existe sous deux formes ; une forme auto-immune, qui correspond à une destruction de cellules β pancréatiques par des anticorps dirigés contre elles, conduisant à une carence en insuline, l'hyperglycémie apparaît lorsqu'il ne reste plus que 10 à 20 % de cellules β fonctionnelles ; et une forme idiopathique qui apparaît le plus souvent dans des ethnies noires d'origines africaines subsahariennes. On ne retrouve d'antécédent familial que dans 1 cas sur 10. Il survient essentiellement avant 20 ans et il connaît un pic d'incidence vers 12 ans, son traitement repose donc sur l'insuline [Grimaldi, 2000 ; Attia, 2008 ; El Ghoul et al., 2011].

À l'opposé, le diabète de type 2 (DNID : diabète non insulino-dépendant) est de loin le plus fréquent se caractérise typiquement par la découverte fortuite d'une hyperglycémie chez un sujet de plus de 40 ans ayant souvent des facteurs de risques cardiovasculaire, dont le principal facteur est le surpoids (surcharge pondérale de prédominance abdominale), et des antécédents familiaux de diabète. Le diabète de type 2 est souvent associé à une hypertension artérielle et/ou à une hypertriglycéridémie. Le diagnostic se fait le plus souvent lors d'un examen systématique. En effet, le diabète de type 2 est asymptomatique, le retard au diagnostic est d'environ 5 ans, ainsi, il expose à des complications dégénératives qui sont présentes dans 50 % des cas au moment du diagnostic. 5 à 10 % des diabétiques subiront une amputation d'orteil, de pied ou de jambe, 4/5 d'entre eux sont des diabétiques non insulino-dépendants.

Le but du traitement de ce type de diabète est de prévenir au maximum l'apparition de ces complications [Drouin, 1999 ; Attia, 2008 ; Noubel, 2009].

La survenue du diabète de type 2, associe dans des proportions variables, à une insulino-résistance à composante génétique, favorisée par l'obésité abdominale et une insulino-pénie relative. Ce trouble explique l'évolution du diabète de type 2 dans 50 % des cas vers l'insulino-résistance [Grimaldi, 2000 ; Arbouche-Lezoul, 2007 ; Attia, 2008].

Le diabète sucré peut être directement responsable de complications aiguës et des complications chroniques (dégénératives). Les complications aiguës sont des urgences métaboliques (malaise voire comas), potentiellement mortelles, par hyperglycémie et acidocétose (insuline non prescrite ou insuffisamment dosée), qui apparaît chez le diabète de type 1 (tout âge), mais aussi par hypoglycémie (chez le DID et le DNID traité par l'insuline ou par sulfamide hypoglycémiant) résultante de l'administration de quantités inadaptées d'insuline, de plus, le coma hyperosmolaire non cétosique apparaît surtout chez le diabète de type 2 (95 % des cas) [Grimaldi, 2000]. Ces complications sont attribuables au déséquilibre biochimique associé à un diabète non contrôlé. Par contre, les complications chroniques et dégénératives du diabète sont de deux types : les microangiopathies qui touchent les petits vaisseaux (la microcirculation), et comprennent , la rétinopathie diabétique qui est la principale cause de cécité et de troubles visuels, la néphropathie diabétique qui se manifeste au niveau des reins par une insuffisance rénale liée à la gravité et à la durée de la maladie, et la neuropathie diabétique touchant les nerfs, la complication la plus courante touche à des degrés divers 50 % des diabétiques voir plus et conduit les cas sévères à l'amputation [Noubel, 2009]. A l'opposition, les macroangiopathies diabétiques (complications cardiovasculaires) sont l'atteinte des artères musculaires allant de l'aorte jusqu'aux petites artères distales d'un diamètre supérieur à 200 µm. Elles associent deux maladies artérielles distinctes, l'athérosclérose (s'accompagne parfois d'une médiocalcose) qui semble histologiquement identique à l'athérosclérose du non diabétique et d'autre part, l'artériosclérose, caractérisée par une prolifération endothéliale et une dégénérescence du média [Attia, 2008 ; El Ghouli et al., 2011].

Pour retarder voir prévenir la survenue et ralentir la progression de ces complications, non seulement plusieurs agents pharmacologiques ont été utilisés mais en plus des mesures hygiénodététiques étaient recommandés dans le but d'obtenir un contrôle glycémique fiable et correct [Khacheba, 2008 ; Virally et al., 2008]. Pour atteindre cet objectif, plusieurs thérapeutiques sont à notre disposition, la diététique (un régime alimentaire bien équilibré en

glucides, en protéines et en lipides) est un élément essentiel au traitement du diabète type 2, au même titre que l'activité physique et la prise des médicaments. La prise en charge diététique est une démarche pas toujours facile à mettre en place qui demande patience et pédagogie de la part du praticien, du patient et de son entourage. Le traitement du diabète de type 1 repose sur l'insulinothérapie ; tandis que le traitement du diabète 2 nécessite non seulement de chercher à diminuer l'hyperglycémie, mais aussi à corriger les autres facteurs de risque vasculaire souvent associés [Attia, 2008 ; Virally et al., 2008 ; Couque, 2010]. Dans le cas d'un diabète de type 2 diagnostiqué, on a recours tout d'abord à un traitement non pharmacologique. Pendant 4 à 6 mois, le patient diabétique doit respecter les règles hygiéno-diététiques : régime réduisant les aliments gras, les boissons sucrées et alcoolisées ; la reprise d'une activité physique régulière pendant 30 à 45 minutes 3 à 4 jours par semaine ; ceci permettra une perte de poids et une réduction significative des valeurs glycémiques, tensionnelles et lipidiques. En cas d'échec après 4 à 6 mois, il faut alors opter pour un traitement médicamenteux, par une monothérapie orale, en premier lieu, utilisant de médicaments antidiabétiques actifs par voie orale à action hypoglycémiante c'est les antidiabétiques oraux, qui sont classés selon leur mode d'action en trois principales catégories, les sulfamides hypoglycémiants, les biguanides et les inhibiteurs des α -glucosidases qui diffèrent par leur modes d'action ainsi que la cible physiopathologique [Medjdoub, 2006 ; Ducobu, 2007 ; Klein, 2009 ; Ferlié, 2011].

En cas d'échec de la monothérapie orale initiale, il est recommandé de prescrire une bithérapie orale c'est à dire d'associer entre elles deux classes d'hypoglycémiants.

- biguanides et sulfamides,
- biguanides et inhibiteurs des α -glucosidases,
- sulfamides et inhibiteurs des α -glucosidases.

Si un diabétique de type II demeure mal équilibré, il faut passer à un traitement par l'insuline. L'insulinothérapie permet d'obtenir une amélioration nette du contrôle glycémique, si ce n'est pas le cas, on peut associer à l'insulinothérapie la prescription de biguanides qui en potentialisent l'action [Chamahi, 2008].

Les sulfamides hypoglycémiants stimulent la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques en les sensibilisant à l'action du glucose, ils sont caractérisés par une activité hypoglycémiante plus marquée [Dey et al., 2002]. Ils agissent au niveau des canaux K_{ATP} (potassium ATP dépanadant) dans les cellules β des îlots de Langerhans, ils se lient à la sous-unité du canal K_{ATP} (SUR), ce qui entraîne la fermeture du canal et stimule la sécrétion d'insuline par un mécanisme semblable à celui du glucose : une augmentation de la

concentration calcique cytosolique [Ferlié, 2011]. Les effets extrapancréatiques des sulfamides sont liés à une diminution de la production hépatique du glucose (néoglucogenèse freinée) et une augmentation de la synthèse de glycogène. Ils augmentent le nombre de récepteurs de l'insuline et la translocation des transporteurs de glucose au niveau musculaire ce qui augmente son utilisation périphérique. Les effets secondaires de cette famille sont principalement l'ictère, vomissements, hypoglycémie et gain de poids lié à l'hyperinsulinémie [Dey et al., 2002 ; Klein, 2009 ; Ferlié, 2011].

À l'opposé des sulfamides, les biguanides (classés en deuxième lieu) n'agissent pas sur la sécrétion insulinaire, ce sont des potentialisateurs d'effets d'insuline [Medjdoub, 2006], ce qui veut dire qu'ils améliorent la sensibilité à l'insuline. Ils ont un effet exclusivement extrapancréatique classé par ordre d'importance au niveau du foie, muscle, tissu adipeux et intestin [Natali et al., 2006]. Les biguanides sont présentés essentiellement par la metformine, qui réduit la production hépatique de glucose, stimule la glycolyse anaérobie dans le muscle, augmente la captation du glucose par les tissus adipeux, diminue le taux de triglycérides et du cholestérol et ralentit l'absorption intestinale de glucose. Ils sont sans effet de prise de poids ; malgré certains effets secondaires qui sont essentiellement gastro intestinaux (Vomissements, diarrhées, transit perturbé), inappétence, amaigrissement, toxicité rénale et notamment acidose lactique, c'est pour ce dernier effet certains biguanides ont été éliminés du marché [Larger, 1997 ; Dey et al., 2002 ; Friedlander, 2005 ; Ferlié, 2011].

Les thiazolidinediones sont des agonistes sélectifs (ligands pharmacologiques) de récepteur nucléaire appelé « peroxisome proliferator-activated receptor γ » (PPAR γ). Ils augmentent et améliorent la sensibilité à l'insuline dans les tissus adipeux et hépatiques, et stimulent le récepteur PPAR γ responsable de la modulation de l'expression de certains gènes qui jouent un rôle dans le métabolisme du glucose, des protéines et des lipides. Les effets indésirables que les thiazolidinediones provoquent sont : Œdèmes, troubles visuels, prise de poids avec un risque de problème hépatique [Friedlander, 2005 ; Ferlié, 2011].

Les Insulino-sécrétagogues (glinidines) appartenant aux antidiabétiques oraux sont surtout actifs sur l'hyperglycémie post prandiale. Ces médicaments utilisés en monothérapie permettent d'obtenir un contrôle glycémique correct qui est évalué tous les 4 mois par un dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c), l'objectif optimal à atteindre est une valeur d'HbA1c inférieure ou égale à 6,5 % [Chamahi, 2008 ; Noubel, 2009].



Une dernière classe des antidiabétiques oraux c'est les inhibiteurs des alpha-glucosidases, atténuant la glycémie post-prandiale. Par leur action directe comme agent inhibiteur des alpha-glucosidases ou alpha-amyloses intestinales en ralentissant la digestion des polysaccharides donc retarder la libération et l'absorption du D-glucose, et aboutissent à une baisse de l'HbA1c [Medjdoub, 2006 ; Odhav et al., 2010 ; Ferlié, 2011 ; Kumar et al., 2011 ; Sales et al., 2012].

Ceci s'est avérée être l'une des meilleures stratégies pour diminuer l'élévation de la glycémie postprandiale chez le diabétique afin d'éviter les complications dégénératives du diabète [Kumar et al., 2011].

L'amylose est aussi appelée « diastase » a été purifiée en 1835 du malt par Anselme Payen et Jean Persoz. Leur recherche les a mené à suspecter que des substances semblables, maintenant connues sous le nom d'enzymes, pouvaient participer dans les processus biochimiques [Benarous, 2006].

Les amyloses sont des biocatalyseurs de réactions biochimiques au sein des organismes vivants. Elles sont utilisées en biotechnologie, pour catalyser les réactions de dépolymérisation des macromolécules et dans l'industrie du papier et textile, à cause de leur spécificité et de leur efficacité [Scriban, 1993 ; Schmid, 2005 ; Yapi, 2009 ; Kumar et al., 2011].

La superfamille des α -amyloses regroupe plusieurs enzymes différentes catalysant plus de 20 réactions diverses, leurs actions touchent les liaisons O-glycosidiques (α -1,4 ; α -1,6 ou encore α -1,1 alors que les liaisons α -1,2 relativement rares dans la nature, ne sont pas hydrolysées par ces enzymes) avec des spécificités endo- ou exo-amylosiques [Rousseau, 2004 ; Devin, 2010]. Les enzymes qui catalysent les liaisons (α -1,4) ou (α -1,4 et/ou α -1,6) agissent en hydrolysant des liens entre les unités de glucose adjacentes, rapportant des produits caractéristiques de l'enzyme impliquée et peuvent être divisés en cinq classes (Tableau n° 1):

1. Enzymes qui hydrolysent les liaisons α -1,4 et non pas les liaisons α -1,6 par exemple l' α -amylose, c'est une endoamylose [Heslot, 1996 ; Aiyer, 2005 ; Schäfer et al., 2007].
2. Enzymes qui hydrolysent les liaisons α -1,4 de l'extrémité non réductrice, sans hydrolyser les liaisons α -1,6 par exemple : β -amylose (EC 3.2.1.2) c'est une exoamylose dont l'action aboutit au maltose comme produit final majeur. Ce type d'enzyme est très répandu chez les végétaux et rare chez les micro-organismes [Scriban, 1993 ; Heslot, 1996 ; Aiyer, 2005 ; Schmid, 2005].
3. Enzymes qui hydrolysent les liaisons α -1,4 et α -1,6 à partir de l'extrémité non réductrice des chaînes, cet hydrolyse aboutit à la libération de β -D-glucose. Toutefois le clivage de la liaison α -1,6 se produit à une vitesse qui est 30 à 50 fois plus faible que la liaison α -1,4 par exemple la

glucoamylase (EC 3.2.1.3) c'est une exoamylase appelée aussi amyloglucosidase [**Scriban, 1993 ; Heslot, 1996 ; Sauer, 2000 ; Aiyer, 2005 ; Schmid, 2005**].

4. Enzymes qui hydrolysent seulement les liaisons α -1,6 par exemple la pullulanase ou limite dextrinase (EC 3.2.1.41), et autres enzymes de branchements ou déramifiantes comme isoamylase (EC 3.2.1.68) qui n'agissent que sur l'amylopectine. Ces enzymes complètent à 100 % les actions liquéfiantes et dextrinisantes des α - et β -amylases [**Scriban, 1993 ; MacGregor et al., 2001 ; Aiyer, 2005 ; Muralikirishna et al., 2005 ; Schmid, 2005**].

5. Enzymes qui hydrolysent préférentiellement les liaisons α -1,4 trouvés dans de courtes chaînes d'oligosaccharides (produites par l'action d'autres enzymes sur l'amylose et l'amylopectine) par exemple l' α -glucosidases, c'est une exoamylase [**Aiyer, 2005 ; Kouame et al., 2005 ; Schäfer et al., 2007**].

Les enzymes α -amylases (EC 3.2.1.1) et les α -glucosidases (EC 3.2.1.20) appartiennent à la superfamille des α -amylases [**MacGregor et al., 2001 ; Devin, 2010 ; Ghadamyari et al., 2010 ; Yezdani et al., 2010**] sont des carbohydrases responsables de l'hydrolyse des oligo et/ou disaccharides en monosaccharides, unités simples qui peuvent être assimilées par l'organisme [**Iulek et al., 2000 ; Devin, 2010 ; Odhav et al., 2010 ; Kumar et al., 2011**]. Les α -amylases (α -1,4-glucan-4-glucanohydrolases ou α -glucohydrolase de D-glucoside) et les α -glucosidases sont des enzymes hydrolytiques appartenant à la famille des hydrolases, qui catalysent la coupure hydrolytique des liaisons C—O, C—N et C—C [**Soro, 2007 ; Faiveley, 2010**]. Elles hydrolysent spécifiquement la liaison α -D-(1,4)-glucosidiques trouvées dans la composition du glycogène, l'amidon et autres oligosaccharides (hydrates de carbone relatifs) soit à partir de l'extrémité non réductrice (α -amylase) ou l'extrémité réductrice (α -glucosidase) donnant naissance à n résidus de D-glucose assimilables [**Schäfer et al., 2007 ; Zibae et al., 2008 ; Yapi, 2009 ; Kumar et al., 2011**].

Tableau n° 1 : Types d'enzymes qui catalysent les liaisons (α -1,4) ou (α -1,4 et/ou α -1,6).

Types d'enzyme Nom commun	Numéro d'identification	Nature de l'enzyme	Types de liaisons hydrolysés	Type de mécanisme	Produit final ou produits finaux
α-amylase	(EC 3.2.1.1)	endoamylase	α -1,4 et non pas les liaisons α -1,6	Mécanisme de rétention d'anométrie.	Maltose, maltotriose et dextrines résiduelles
β-amylase	(EC 3.2.1.2)	exoamylase	α -1,4 de l'extrémité non réductrice, sans hydrolyser les liaisons α -1,6	Mécanisme d'inversion d'anométrie.	maltose
glucoamylase ou amyloglucosidase	(EC 3.2.1.3)	exoamylase	α -1,4 et α -1,6 à partir de l'extrémité non réductrice des chaînes	Mécanisme d'inversion d'anométrie.	β -D-glucose
la pullulanase ou limite dextrinase isoamylase	(EC 3.2.1.41) (EC 3.2.1.68)	enzymes de branchements ou déramifiantes	seulement les liaisons α -1,6		complètent à 100% les actions liquéfiantes et dextrinisantes des α - et β -amylases
α-glucosidases	(EC 3.2.1.20)	exoamylase	préférentiellement les liaisons α -1,4 trouvés dans de courtes chaînes d'oligosaccharides	Mécanisme de rétention d'anométrie.	Glucose

L' α -amylase constitue, une famille des endoamylases, un groupe d'enzymes omniprésentes répandues dans tous les organismes vivants ; elles sont largement distribuées dans les sécrétions de micro-organismes, plantes et chez les animaux au niveau membranaire de la surface de l'épithélium des villosités de l'intestin grêle [Bompard-Gilles et al., 1996 ; Heslot, 1996 ; Schäfer et al., 2007 ; Devin, 2010 ; Sales et al, 2012]. La majeure partie des α -amylases se trouve à l'extérieur des cellules productrices : en effet, les polysaccharides étant de grosses molécules, ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur des cellules, pour y être hydrolysés. Ces dernières sont donc contraintes de sécréter leurs amylases dans le milieu extracellulaire où se réalise l'hydrolyse [Khacheba, 2008],

Plusieurs α -amylases végétales, animales (mammifères) et microbienne (bactériennes, fongique ...) ont été purifiées et étudiées (Tableau n° 2).

Tableau n ° 2 : Quelques propriétés des α -amylases [Khacheba, 2008].

Enzymes d'origine	exemples	Poids moléculaire (Da)	pH optimal	Température optimale (°C)
Animal	Salive humaine	50 000	6,9	40
	Pancréas de porc	50 000	6,9	37
Végétale	Malt d'orge	59 500	4,7 - 5,4	50 - 55
	Blé	59 500	4,6	60 - 66
Microbienne	<i>Bacillus coagulans</i>	49 000	5,2	57
	<i>Aspergillus oryzae</i>	52 600	5,5 - 6,9	40

L' α -amylase appelée la ptyaline, est produite par les glandes salivaires, tandis que l'amylase pancréatique est sécrétée par le pancréas dans le petit intestin. La Ptyaline commence la digestion du polysaccharide dans la bouche ; le processus est complété dans le petit intestin par l'amylase pancréatique, parfois appelée l'amylopsine [Benarous, 2006]. donc les glucides alimentaires complexes sont dégradés en premier lieu par l'amylase salivaire et pancréatique en disaccharides (saccharose, lactose, maltose) et en seconds lieu par les alpha glucosidases en monosaccharides (saccharase, lactase, maltase ou invertase) [Attia, 2008], ce qui facilite leurs absorptions par l'intestin grêle [Kumar et al., 2011]. Les α -amylases salivaires et pancréatiques

ont été les plus étudiées à cause de leur accessibilité et de leur rôle dans les phénomènes de digestion chez les mammifères [Khacheba, 2008].

Les α -amylases pancréatiques de l'homme (dans les systèmes digestifs) et beaucoup d'autres mammifères, souris, porc et rat présentent un important degré d'homologie au niveau de leurs séquences en acides aminés [Bompard-Gilles et al., 1996 ; Ramasubbu et al., 2005] ; Pour accomplir leurs fonctions enzymatiques, elles ont, une structure tridimensionnelle qui les rend capable de se lier au substrat, et des groupes catalytiques hautement spécifiques dont l'action favorise la rupture de liaisons glucosidiques [Iulek et al., 2000]. Après la résolution de plusieurs structures tridimensionnelles, il apparaît que ces enzymes ont une structure de base commune (domaines A, B, C) [Qian et al., 1997 ; Devin, 2010 ; Sales et al., 2012], ces structures ont rapporté des perspectives sur l'attachement du substrat et sur le processus catalytique de l' α -amylases [Iulek et al., 2000].

L' α -amylase pancréatique humaine (APH) est une enzyme monomérique et multidomaine qui contient 3 domaines (figure 1 a), et est composée de 512 acides aminés en une seule chaîne de polypeptide liée aux ions essentiels de chlorure et de calcium, son poids moléculaire est de 57.6 kDa [MacGregor et al., 2001 ; Sales et al., 2012].

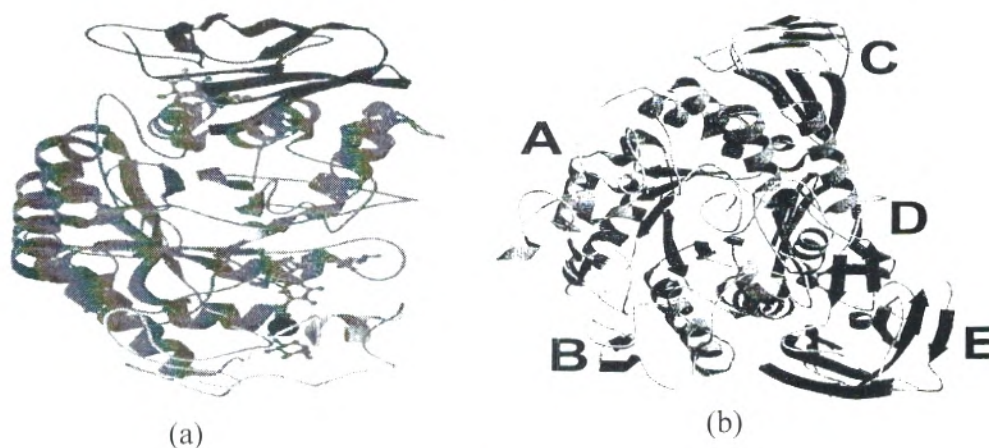


Figure 1 : Structure de l' α -amylase pancréatique humaine (a), les différents domaines d'une amylase (b) [Qian, 1997 ; MacGregor et al., 2001 ; Devin, 2010].

A : porte le site catalytique ; B : responsable de la spécificité du substrat ; E : lie l'amidon ; C, D, et E sont des feuillets β antiparallèles (domaines latéraux).



Plusieurs domaines conservés ont été identifiés pour cette enzyme, le domaine A, B et C ; la figure 1 (a) montre : le domaine A de couleur rouge forme un tonneau (β/α)₈ et porte le site actif à la partie carboxy-terminale (C₁) des feuillets β [Heslot, 1996 ; Qian et al., 1997 ; Ramasubbu, 2003 ; Muralikirishna et al., 2005 ; Moreno et al., 2010], ce site contient environ 280-300 résidus, la triade catalytique représentée par deux acides aspartiques et un acide glutamique, est présente dans ce domaine. Les acides aminés conservés impliqués dans la liaison au substrat et dans la réaction catalytique (communs à la plupart des enzymes amylolytiques) sont localisés dans la partie C – terminale du domaine A et B [Sales et al., 2012] ou dans la partie C – terminale des feuillets β du domaine A [Devin, 2010], ce dernier, est le plus conservé et est retrouvé au sein de toutes les enzymes de cette famille [MacGregor, 2001 ; Khacheba, 2008 ; Devin, 2010].

Le domaine B de couleur jaune (inséré entre le domaine A et le domaine C) est lié au domaine A par les ponts disulfures [Sales et al., 2012], ce domaine est également retrouvé chez toutes ces enzymes et est impliqué dans la liaison au substrat ou la liaison au Ca²⁺, tous les α -amylases lient au moins un ion fortement conservé de Ca²⁺ (sphère bleue qui se trouve entre les deux domaines A et B) qui est exigé pour l'intégrité structurale, en contrôlant la géométrie du site actif de ces enzymes, il régule leur activité enzymatique (activateur allostérique assurant un effet positif) [Heslot, 1996 ; Qian, 1997 ; MacGregor, 2001 ; Benarous, 2006 ; Khacheba, 2008 ; Devin, 2010 ; Sales et al., 2012]. Les α -amylases peuvent donc être considérées comme étant des métallo-enzymes « enzymes nécessitant un ion métallique (qui stabilisent la structure protéique par des liaisons ioniques) pour leur activité et, en fonction des conformations, il peut y avoir de 1 à 9 ponts calciques. Le calcium n'intervient pas sur l'hydrolyse, mais l'effet protecteur du calcium sur la structure de l'enzyme est intéressant. Cependant, si le calcium, à faibles doses, a un effet activateur sur les α -amylases, cette activation peut diminuer, à des doses élevées, pour certaines de ces enzymes [Devin, 2010 ; Faiveley, 2010]. Enfin le domaine C en noir présente une structure, de feuillets β , liée au domaine A par une chaîne simple de polypeptide et il semble être un domaine indépendant avec une fonction inconnue [Ramasubbu, 2003 ; Sales et al., 2012]. L'ion de calcium et l'ion de chlorure (sphère jaune) sont deux groupements prosthétiques, ils sont également montrés à proximité immédiate du centre catalytique. Le ligand acarbose (l'inhibiteur) présenté par des boules et bâtons en vert est lié au site actif. Le site actif (qui fixe le substrat) de l' α -amylase est situé le long du vide qui se trouve entre le C₁ des deux domaines A et B [Ramasubbu, 2003 ; Ramasubbu et al., 2005 ; Sales et al., 2012]. Des ligands de monosaccharide et de disaccharide sont liés à la surface du site de fixation [Qian, 1997 ; MacGregor, 2001 ; Benarous, 2006]. Neuf autres domaines ont été identifiés chez d'autres

types d'amylases selon leurs mode d'action, le domaine D, notamment le domaine E ou « domaine de fixation à l'amidon », dans le cas des enzymes de branchements, qui interagissent avec le substrat (figure 1 b), ou encore les domaines F, G et H retrouvés du côté N terminal et présent chez les enzymes qui hydrolysent les liaisons α -1,6 de substrat branchés à l'intérieur de la chaîne [Devin, 2010].

Les spécificités diverses en substrats et en produits, des enzymes de cette famille pourraient s'expliquer par l'attachement de différents domaines au noyau catalytique en fonction de l'enzyme [Devin, 2010]. C'est ce qui prouve l'existence d'une similitude globale entre les structures de l' α -amylase mais de petites différences structurales mènent aux différents profils d'hydrolyse et d'inhibition [Iulek et al., 2000].

On sait aujourd'hui qu'il existe près de 25 formes tridimensionnelles différentes des α -amylases avec des propriétés qui peuvent varier en fonction des conformations [MacGregor, 2001 ; Faiveley, 2010]. Quelle que soit la conformation du site actif de l'enzyme, l'activité des amylases reste essentiellement dépendante du pH et de la température. Le pH modifie la charge électrique des acides aminés présents sur le site catalytique, ce qui rend impossible les réactions de transferts d'atomes, nécessaires à la rupture des liaisons osidiques. La température favorise la formation du complexe enzyme-amidon [Faiveley, 2010].

Le mode d'action des amylases est peu connu et est fondé sur des probabilités [Sales et al, 2012], il est décrit en 4 étapes : étape 1, formation du complexe enzyme/substrat ; étape 2, l'attaque de la liaison α -1,4 par l'acide glutamique, formation d'une liaison covalente entre le carbone C1 et l'acide aspartique et libération d'une partie de la chaîne carbonée ; étape 3, le retour à l'état initial de l'enzyme par l'intervention d'une molécule d'eau ; étape 4, l'éjection du produit ; la figure 2 (a et b) illustre les différents mécanismes biochimiques mises en jeu.

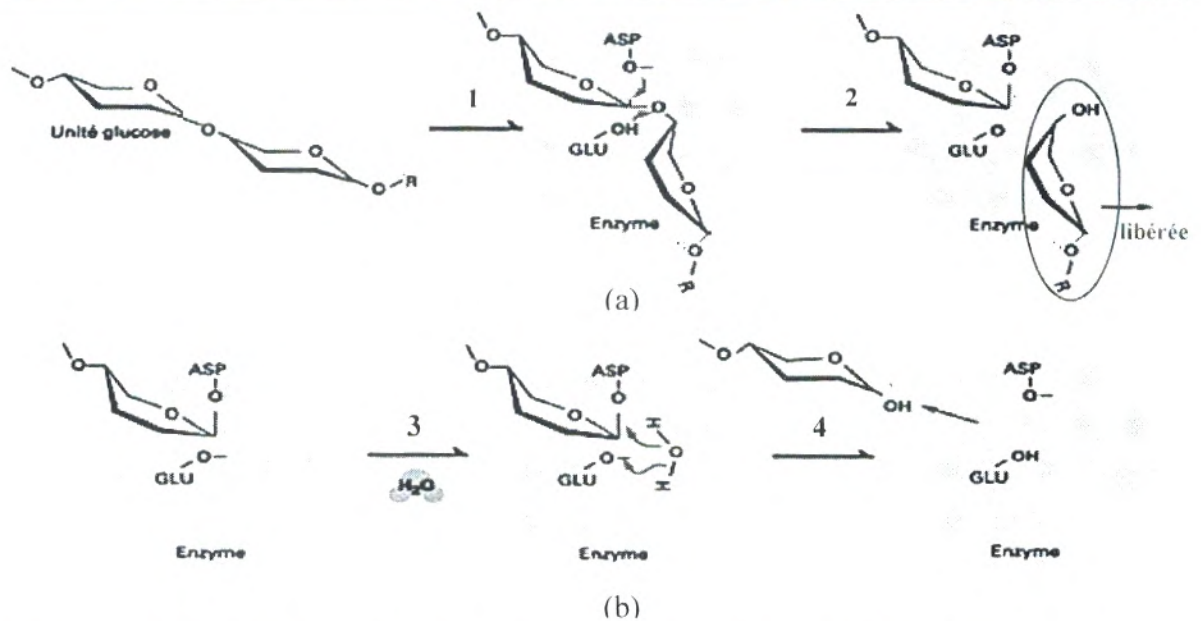


Figure 2 (a et b) : Mode d'action des α -amylases (catalyse acide/base) [Faiveley, 2010].

L'enzyme se fixe par affinité sur l'intérieur de la chaîne ou sur les extrémités réductrices (étape 1 sur la figure 2). Il se forme alors un complexe enzyme-substrat [Faiveley, 2010]. Leur action sur l'amidon semble être liée aux possibilités de pénétration de l'enzyme à l'intérieur de la chaîne et en particulier, à ses possibilités d'attaque en surface, c'est aussi selon la sensibilité de l'amidon à l'attaque de l'enzyme (de ce fait, chaque grain appartenant à une population d'un type d'amidon donné, a sa propre sensibilité à l'attaque de l'enzyme) [Devin, 2010]. On distingue généralement, les amidons faciles à s'hydrolyser par l' α amylase (amidon de céréales et de légumineuses à teneur normale en amylose) et les amidons plus résistants à l' α amylase (amidon de pomme de terre) [Khacheba, 2008].

Les chaînes d'amidon déformées par le complexe enzyme-substrat et stabilisées par un grand nombre de liaisons hydrogènes entre les acides aminés du site de fixation de l'enzyme et les groupements polaires (OH) de la chaîne carbonée [Faiveley, 2010].

Au niveau de la liaison osidique située sur le site catalytique, l'acide glutamique est à l'origine de l'attaque, sous sa forme protonée (au pH optimal de l'enzyme), il fournit un atome d'hydrogène à l'atome d'oxygène de la liaison osidique à couper situé sur le carbone C4 de la chaîne, ce qui entraîne une rupture de la liaison osidique. L'acide aspartique est en revanche ionisé au pH optimal de l'enzyme ; fortement électronégatif, il établit une liaison covalente avec le carbone anomérique ou C1, ce qui permet alors la libération de la première partie de la chaîne carbonée c'est l'étape 2 de la figure [Khacheba, 2008 ; Devin, 2010 ; Faiveley, 2010 ; Sales et al, 2012].



Au cours de la 3^{ème} étape l'enzyme retourne à l'état initial, cette étape est assurée par une molécule d'eau qui va hydroxylé le carbone anomérique, pour cliver la liaison covalente entre ce dernier et l'acide aspartique. L'acide glutamique, chargé négativement, capte un proton de la molécule d'eau, le groupement OH restant, instable, se fixe sur le carbone anomérique ou C1 après le clivage de la liaison entre C1 et l'acide aspartique, cette réaction rend possible l'éjection de la deuxième partie de la chaîne carbonée c'est l'étape 4 [Khacheba, 2008 ; Devin, 2010 ; Faiveley, 2010 ; Sales et al, 2012]. Donc l'acide glutamique semble jouer un rôle important dans la catalyse, ce résidu serait un donneur de proton et aurait donc une fonction de catalyseur général acide ou électrophile, de même, l'acide aspartique jouerait le rôle de catalyseur général basique ou nucléophile sur les transferts réactionnels permettant la rupture de la chaîne, c'est une réaction nucléophile [Heslot, 1996 ; Qian, 1997 ; Ramasubbu, 2003 ; Muralikrishna, 2005 ; Faiveley, 2010 ; Sales et al, 2012].

L'action des α -amylases sur les chaînes d'amidon est séquentielle : l'enzyme se fixe sur la chaîne puis poursuit son attaque en se déplaçant le long de la chaîne d'amidon [Khacheba, 2008]. L'action des α -amylases sur les chaînes d'amidon aboutit, dans le cas des chaînes linéaires (amylose), à l'hydrolyse totale en unités de maltose et maltotriose [Schmid, 2005]. Mais dans le cas de l'amylopectine, l'hydrolyse des liaisons α -1,4-glucosidiques se fait mal au voisinage des points de ramification et, en outre les liaisons α -1,6-glucosidiques qui constituent ces points de ramification ne sont pas attaquées [Scriban, 1993 ; Schmid, 2005 ; Sales et al, 2012]. D'où l'obtention d'un mélange de maltotriose et de dextrans résiduelles (ou dextrans limites, matériel non digestible par α -amylase) formées d'oligo et polysides branchés, ces polysides de 6 à 8 résidus de glucose contiennent tous des liaisons α -1,6 de la macromolécule d'origine, et plus rarement l'obtention de glucose (figure 3) [Scriban, 1993 ; Schmid, 2005 ; Khacheba, 2008 ; Sales et al, 2012]. D'autres enzymes amylolytiques participent au processus de l'hydrolyse de l'amidon c'est la glucoamylase (ou pullulanase, ...) et l' α -glucosidase [Scriban, 1993 ; Heslot, 1996 ; Schmid, 2005], car l' α -amylase catalyse seulement l'hydrolyse initiale de l'amidon mais sa contribution est primordiale pour le déclenchement de ce processus [Devin, 2010 ; Sales et al, 2012]. Les produits d'hydrolyse de l'amidon varient selon l'origine de l' α -amylase, celle du substrat et les conditions d'hydrolyse. Cela permet de classer les α -amylases en deux catégories : Les α -amylases liquéfiantes (ou dextrinisante) qui hydrolysent 30 à 40 % d'amidon et les α -amylases saccharifiantes qui peuvent hydrolyser jusqu'à 50 à 60 % d'amidon [Scriban, 1993 ; Moreno et al., 2010].

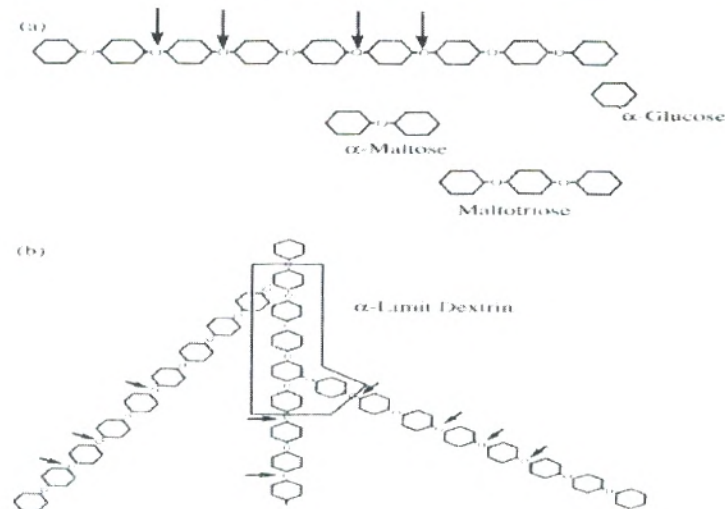


Figure 3 : Le mode d'action de l' α -amylase sur l'amylose (a), et sur l'amylopectine (b)
[Muralikrishna et al., 2005].

Les inhibiteurs synthétiques de la glucosidase les plus connus et qui sont conventionnellement employés dans le contrôle du diabète sont, l'acarbose (Glucor), agit en inhibant par compétition et de façon réversible l'enzyme [Schäfer et al., 2007 ; Hamza, 2011], le voglibose et miglitol (Diastabol), [Van de Laar et al., 2005] ont pour effet de prolonger l'absorption des glucides; ils doivent être pris au moment d'un repas pour être efficaces [Rousseau, V ; 2004 ; Kalubim et al., 2010 ; Odhav et al., 2010]. L'acarbose, le miglitol et le voglibose peuvent être utilisées en monothérapie ou en association avec les sulfamides, les biguanides ou l'insuline [Chamahi, 2008]. L'acarbose est un pseudotétracosaccharide (Figure 4), produit par *Actinoplanes* sp, constitué d'un cyclitol en C7 renfermant une double liaison éthylénique avec trois hydroxyles en 4, 5 et 6 et une fonction alcool primaire en position allylique sur C3. Ce cyclitol est relié par son C1 à l'azote d'un amino-sucré : le 6-désoxy-4 aminoglucose. L'ensemble cyclitol et viosamine est appelé : acarviosine, cette dernière est liée par son C-1 hémiacétalique au C-4 d'un maltose. L'acarbose est un inhibiteur compétitif et réversible de l' α -amylase pancréatique et l' α -glucosidase intestinales, il joue le rôle d'un faux substrat et retarde ainsi l'hydrolyse des glucides complexes, ceci a pour conséquence un étalement dans le temps du passage sanguin du glucose avec réduction de l'hyperglycémie post prandiale sans entrainer une hyperinsulinémie [Mbodj, 2003 ; Schmid, 2005 ; Klein, 2009 ; Uchida et al., 2010].

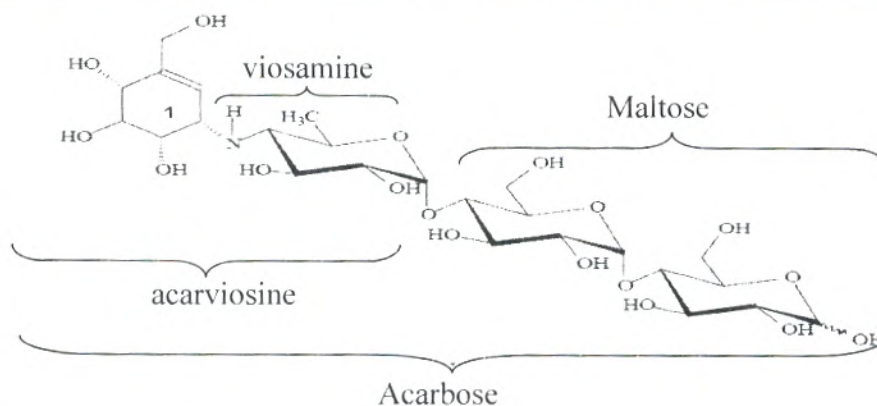


Figure 4 : La structure d'acarbose [Sales et al, 2012].

Il reste peu clair si les inhibiteurs d'alpha-glucosidase influencent la mortalité ou la morbidité des patients souffrant du diabète type 2. Réciproquement, ils exercent un effet significatif sur le contrôle glycémique et sur le taux d'insuline, mais aucun effet statistiquement significatif sur les lipides et le poids corporel. Ces effets sont moins sûrs quand des inhibiteurs d'alpha-glucosidase sont employés pour une plus longue durée. Les dosages d'acarbose plus haut que 50 mg n'offre aucun effet additionnel sur l'hémoglobine glyquée mais plus d'effets nuisibles. Comparé au sulphonylurées, les inhibiteurs d'alpha-glucosidase abaissent le taux d'insuline en période de jeûne ou post-prandiale et ont un profil inférieur concernant le contrôle glycémique et les effets nuisibles [Van de Laar et al., 2005]. Cependant, ces médicaments sont associées à des effets indésirables gastro-intestinaux ; liés à la fermentation par les bactéries intestinales des sucres non-absorbés, tels que la douleur abdominale, flatulence, ballonnements et diarrhée, chez les patients traités avec [Bnouham et al., 2010 ; Kalubim et al., 2010], ces troubles cèdent souvent deux à trois semaines après le début du traitement [Chamahi, 2008].

A fin de diminuer ou d'éviter les effets indésirables de ces molécules, il est nécessaire d'identifier les inhibiteurs d'amylase à partir de ressources naturelles ayant peu ou moins d'effets secondaires [Odhav et al., 2010]. Les plantes ont été toujours une source exemplaire de médicaments et beaucoup de médicaments actuellement disponibles dérivent directement ou indirectement de plantes [Odhav et al., 2010 ; Donga et al., 2011]. Beaucoup d'inhibiteurs d' α -glucosidase qui sont des phytoconstituents, tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, terpénoïde, anthocyanides, glycosides ou les composés phénoliques, ainsi de suite. Les flavonoïdes naturels en tant qu'inhibiteurs d' α - glucosidase, α - amylase et reductases d'aldose, ont fait l'objet de plusieurs recherches [Kumar et al., 2011].

Ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été faits pour identifier des inhibiteurs efficaces de l' α -glucosidase à partir des ressources naturelles afin de développer de nouveaux composés antidiabétiques pour le traitement du diabète [Kumar et al., 2011 ; Saha et al., 2012]. Le tableau ci-dessous résume l'effet de quelques plantes médicinales sur l'activité de quelques amylases.

Tableau n° 3 : Effet de quelques plantes médicinales sur l'inhibition de quelques amylases *in vitro*.

Parties utilisées	Extraits	Effets biologiques	Références
feuilles <i>Cecropia obtusifolia</i> (Cecropiaceae)	L'extrait butanolique	la concentration inhibitrice de 50 % de l'activité de l' α -glucosidase. IC ₅₀ =14 μ g/mL a montré une activité inhibitrice plus forte que l'acarbose (IC ₅₀ =128 μ g/mL), inhibiteur de référence.	[Ferlié, 2011]
l'écorce d' <i>Acosmium panamense</i> (Fabaceae)	L'extrait éthanolique	IC ₅₀ =109 μ g/mL de l'extrait est similaire à celle de l'acarbose (IC ₅₀ =128 μ g/mL).	[Andrade-Cetto et al, 2008]
le cortex de la racine de <i>Malmia depressa</i> (Annonaceae).	L'extrait butanolique	IC ₅₀ =21 μ g/mL de l'extrait a montré une activité inhibitrice plus forte que l'acarbose (IC ₅₀ =128 μ g/mL)	[Andrade-Cetto et al, 2008]
Les graines de <i>Syzygium cumini</i> (Myrtaceae)	L'extrait hydroéthanolique	Cet extrait était environ 5 fois plus actif contre l' α -glucosidase de <i>B. stearothermophilus</i> (IC ₅₀ =4,6 μ g/mL.) que celle de la levure boulangère (IC ₅₀ =24,6 μ g/mL), et environ 60 et 30 fois plus actif contre les enzymes des mammifères : la sucrase (IC ₅₀ =299,5 μ g/mL) et la maltase (IC ₅₀ =120,9 μ g/mL).	[Shinde et al., 2008]
	l'extrait acétonique	trois fois plus actif contre <i>B. stearothermophilus</i> (IC ₅₀ =6,6 μ g/mL) que la levure boulangère (IC ₅₀ =19,5 μ g/mL) et environ 40 et 15 fois plus actif contre la sucrase (IC ₅₀ =261,7 μ g/mL) et la maltase (IC ₅₀ =114,4 μ g/mL).	
Les feuilles et les parties aériennes d' <i>Andrographis paniculata</i> (Acanthaceae)	l'extrait éthanolique	sur les α -glucosidase de levure, la plus forte concentration de 62,5 mg/mL de la plante montre une inhibition maximale proche de 89 %, et la concentration de 1,95 mg/mL inhibe 3,2 %. Sur les α -amylase porcine les IC ₅₀ d'AP, de l'acarbose étaient de 50,9 et 14,9 mg/mL respectivement. La plante avait une activité inhibitrice d' α -glucosidase appréciable et faible pour l' α -amylase.	[Subramanian et al., 2008]
Les feuilles de <i>Tecoma stans</i> (Bignoniaceae)	Extrait aqueux (avec un rendement de 22%)	L'extrait inhibe 20 et 55 % de la production de glucose provenant des féculents à 0,2 et 1,0 mg/mL. En parallèle, l'acarbose (0,1 mg/mL) inhibe plus de 95 % des α -glucosidases. L'infusion de <i>T. stans</i> préparée selon la médecine traditionnelle (1,15 g de feuilles sèches dans 250 mL d'eau) inhibe 58 % des α -glucosidases.	[Aguilar-Santamaría et al., 2009]
Les fleurs de <i>Punica granatum</i> (Punicaceae)	L'extrait méthanolique (avec un rendement de 40%)	Cet extrait a un effet plus puissant inhibiteur car son IC ₅₀ =1,8 μ g/mL. En augmentant les concentrations d' α -glucosidase de 0,3 à 6 U/mL, cela augmente l'IC ₅₀ de l'extrait de 0,8 à 23,5 μ g/mL. L'IC ₅₀ de l'extrait augmentait aussi de 1,4 à 2,6 μ g/mL, lorsque les concentrations de sucrose passaient de 7,5 à 120 mM. En augmentant le temps de prétraitement de l'extrait de 0 à 120 minutes, cela améliorait progressivement l'effet de l'extrait avec un IC ₅₀ passant de 2,2 à 1,2 μ g/mL.	[Ferlié, 2011]

En Algérie, la médecine traditionnelle encore largement utilisée, constitue un patrimoine à conserver. Plusieurs plantes ou mélanges de plantes sont utilisées dans cette région, et nombreuses d'entre elles sont considérées traditionnellement comme antidiabétique [Khacheba, 2008 ; Hamza, 2011]. La plante la plus utilisée dans cette région est la coloquinte du nom scientifique *Citrullus colocynthis*, elle est traditionnellement employée comme anti-inflammatoire, insecticide et comme purgative pour traiter la constipation [Al-Ghaithi, 2004 ; Atef et al., 2011], en tant qu'abortif et aussi pour traiter l'œdème, infections bactériennes, et contre les maladies chroniques cancer et diabète [Kumar et al, 2008 ; Al-Khateeb et al., 2009 ; Atef et al., 2011 ; Nadeem Asghar, 2011] la coloquinte peut être aussi indiquée contre les maladies du foie [Hireche, 2004]. Elle est utilisée dans les industries agroalimentaires vis à vis son effet antioxydant [Kumar et al, 2008 ; Nadeem Asghar, 2011].

La coloquinte est une plante herbacée appartient à la famille cucurbitacée d'origine tropicale c'est une espèce méditerranéenne, très commune dans tout le Sahara et l'occident, qu'on trouve à l'état spontanée tout autour du bassin méditerranéen, son appellation populaire : Hadja, handhal, tfrist ou taferzizt [Otang –Ntui et al., 2010]. La plante à le port rampant d'un concombre, à tige munie de vrille ramifiées, feuilles palmatilobées à 3-5 segments, charnues, crénelées ; ses fleurs sont jaunes (jaune, pâle ou verdâtre) et dioïques, elles sont solitaires, à pédoncules courts, axillaires; corolle à 5 pétales ovales, à marge sineuse; 5 étamines à anthères épaisses se touchant entre elle. Les fruits globuleux de 12 à 18 cm, à épicarpe coriace, de couleur jaune- clair et à pulpe blanchâtre, charnus à saveur très amère. La partie utilisée de la coloquinte et généralement le fruit et ses principes actifs sont : Glucoside amer, pectine, saponines, résines, alcaloïdes, colocynthine, citrullol (alcool), cucurbitacines, citrulline, citrulluene, acide citrullinique, huile essentielle [Atole et al., 2009 ; Otang –Ntui et al., 2010]. Ses principes les plus actifs : la colocynthe et la colocynthine. Cette dernière confère à la plante un effet purgatif extrêmement violent et dangereux, qui provoque généralement des hémorragies intestinales dont l'issue est souvent fatale. Le seul intérêt de cette plante réside dans les substances pharmaceutiques qu'on a pu en tirer et auxquels on reconnaît un effet hypoglycémiant [Otang –Ntui et al., 2010 ; Atef et al., 2011].

La coloquinte contient 13.5 % de protéines, 26,6 % des huiles, 2,1 % de cendre 52.9 % de fibres bruts, 4,9 % d'azote libre et contient 322 mg/100g de potassium, 119 mg/100 g de phosphore et 3,3 mg/100 g de fer [Sawaya et al, 1986] et elle est riche en lipides et vitamines A, B1, B2 et C [Otang –Ntui et al., 2010].

Les manifestations cliniques rapportées à l'intoxication par la coloquinte comprennent des vertiges, des épigastralgies, des nausées, des vomissements et une diarrhée [El-Faraj, 1995]. El-Wasfi et al. (1994) a démontré que 800 mg/kg de l'extrait éthanolique de ses feuilles est toxique pour les rats, et entraîne la mort de 60 % des rats de la population testée après 24 heures de traitement.

Concernant le traitement du diabète par la coloquinte différents modes d'utilisation et différentes parties de cette plante sont utilisées, une décoction de 30 g de grains broyées dans un litre d'eau et une prise orale de 50 ml de la préparation trois fois par jours ; une utilisation de tout le fruit dans un bain pour les pieds ; ou l'utilisation de la poudre de l'épicarpe séché et mélangé avec les aliments ou encore une prise sublinguale de 2 à 3 grains séchées par jours [Merzouki et al., 2000 ; Said et al., 2002 ; Lev et al., 2002].

Tableau n° 4 : Quelques travaux réalisés sur l'activité anti-hyperglycémique des différents extraits préparés à partir de différentes parties (graines et fruits) de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*).

Parties utilisées	Extraits	Effet anti-hyperglycémiant	Références
Les graines du fruit	Huile de la coloquinte (7.9 mM)	Après 2 mois de régime alimentaire supplémenté en huile de coloquinte donné aux rats rendus diabétiques par la streptozotocine (STZ), l'hyperglycémie est devenue beaucoup moins sévère. Cet huile avait aussi un effet protecteur et/ou régénérateur vis-à-vis la masse de cellules β pancréatiques chez ce groupe de rats.	[Sebbagh et al., 2009]
La pulpe du fruit	Extrait éthanolique (250 μ L équivalent de 300 mg/kg)	Les résultats ont démontré que l'administration orale de l'extrait éthanolique de la pulpe pendant 50 jours chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine (STZ), a conduit à une diminution significative du taux du glucose dans le sang d'environ 31%, et au même titre à une augmentation de 370.2 % du taux de l'insuline dans le sérum.	[Al-Khateeb et al., 2009]
La pulpe du fruit	Extrait éthylique (50 mg/kg/jour)	L'administration oral de cet extrait durant 50 jours chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine (STZ), a diminué de façon significative le taux du glucose dans le sang et avait un effet protecteur contre la néphropathie qui présente une complication micro-vasculaire.	[Atef et al., 2011]
Les graines du fruit	Extrait aqueux (5 ml/kg)	Après une administration I.P de l'extrait chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine (STZ), une diminution significative de l'hyperglycémie, à court et à long termes (7 et 14 jours) avec prévention de chute de poids corporel chez ce groupe de rats.	[Benariba et al., 2009]
Les graines du fruit	Acétate d'éthyle (10, 20 mg/kg)	Une faible diminution de l'hyperglycémie est obtenu chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine (STZ), injectés par vois IP durant 3 semaines.	[Medjdoub, 2009 ; Bentabet, 2010 ; Zerriouh, 2010]
Les graines du fruit	Extrait de glycoside et d'alcaloïdes	Une diminution régulière de l'hypoglycémie chez les rats diabétiques durant 5 semaines. Une stimulation de la captation du glucose, <i>in vitro</i> par les adipocytes isolés des rats Wistar.	[Azzi, 2007]
Les graines du fruit	Extraits des acides aminés (40 mg/kg)	Au bout de 6 heures, 0, 1 à 5 mg/ml régule l'hyperglycémie chez les rats diabétiques, provoque une diminution rapide de l'hyperglycémie par voie orale et stimule la sécrétion d'insuline <i>in vitro</i>	[Benariba, 2003]
Les graines du fruit	Extrait éthanolique et chloroformique des glucosides (20 mg/kg)	<i>In vitro</i> , une stimulation de la captation du glucose par les adipocytes isolés des rats Wistar. <i>In vivo</i> , il présente un effet anti hyperglycémiant chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine, à court terme et à long terme.	[Azzi, 2007]

Selon les résultats publiés sur la coloquinte pratiquement pas de travail qui s'intéresse à l'effet des extraits de la coloquinte sur l'activité de l' α -amylase. Dans ce but, nous envisageons tester au cours de notre étude *in vitro*, l'effet de cette plante sur l'activité de l' α -amylase.

Le plan de notre travail regroupe :

- Une préparation de l'extrait aqueux et organique à partir du fruit de la coloquinte ;
- Une analyse phytochimique en testant la présence ou l'absence de certains métabolites secondaires (les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les terpènes, ...)
- Un dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits préparés ;
- Un test *in vitro* de l'effet des extraits sur l'activité de l' α -amylase.

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour notre étude est le fruit de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) récolté à maturité en mois d'Octobre 2011 dans la région d'Ain Safra wilaya de Naâma (sud ouest Algérien).

Au sein de notre laboratoire les fruits sont triés, coupés et séchés à température ambiante et à l'abri du soleil pendant quelques semaines. Après séchage, les fruits sont entièrement concassés et conservés à l'abri de l'humidité, jusqu'au jour d'utilisation.

2. Extractions

2.1 Préparation de l'extrait aqueux (EA)

- 30 g du fruit entier (graines, pulpe et épicarpe) broyé est mis en infusion dans 300 ml d'eau distillée pendant 1 heure à 50 °C ;
- L'ensemble est porté sous reflux pendant 15 minutes à 250 °C avec agitation ;
- Filtration de la solution obtenue ;
- Le filtrat récupéré est évaporé à sec ;
- Récupération du produit.

La préparation des extraits organiques à partir du fruit entier de la coloquinte est réalisée suivant le protocole de la **figure 5**.

2.2 Préparation de l'extrait hydro-méthanolique (EM)

- Dans 200 ml de mélange eau/méthanol (20/80), 30 g du fruit entier (graines, pulpe et épicarpe) broyé est soumis à une extraction sous reflux, à chaud et sous agitation pendant 3 heures. L'extraction est réalisée deux fois sur le même échantillon (percolation).
- Filtration du mélange et récupération du filtrat.
- Évaporation à sec du filtrat.
- Récupération de l'extrait sur les parois du ballon d'évaporation.

2.3 Préparation de l'extrait d'hexane (EH)

Cet extrait est récupéré à partir de l'extrait EM, après extraction et concentration de l'extrait EM, la phase aqueuse récupérée est traitée par une extraction liquide-liquide en utilisant l'hexane (V/V) ;

- La phase organique récupérée est évaporée à sec.
- Récupération de l'extrait hexanique (EH).



2.3 Préparation de l'extrait acétate d'éthyle (EAc)

Cet extrait est aussi récupéré à partir de l'extrait EM, après extraction et concentration de l'extrait EM et traitement de la phase aqueuse récupérée par l'hexane, la phase récupérée est traitée deux fois par une extraction liquide-liquide en utilisant l'acétate d'éthyle jusqu'à épuisement total de cette solution.

- La phase organique (acétate d'éthyle (V/V)) récupérée est évaporée à sec.
- Récupération du produit (EAc).

2.4 Préparation de l'extrait n butanol (En-B)

Après extraction liquide-liquide de l'extrait EM par l'hexane et acétate d'éthyle la phase aqueuse issue est soumise à une autre extraction liquide-liquide avec le n-butanol.

- La phase organique récupérée est évaporée à sec par une distillation.
- Récupération du produit (En-B).

2.5 Rendement de l'extraction

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

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

P₁ : Poids du tube rempli ;

P₂ : Poids du tube vide ;

P₃ : Poids de la matière végétale de départ.

Les rendements sont calculés par rapport à 100 g de matière végétale sèche.

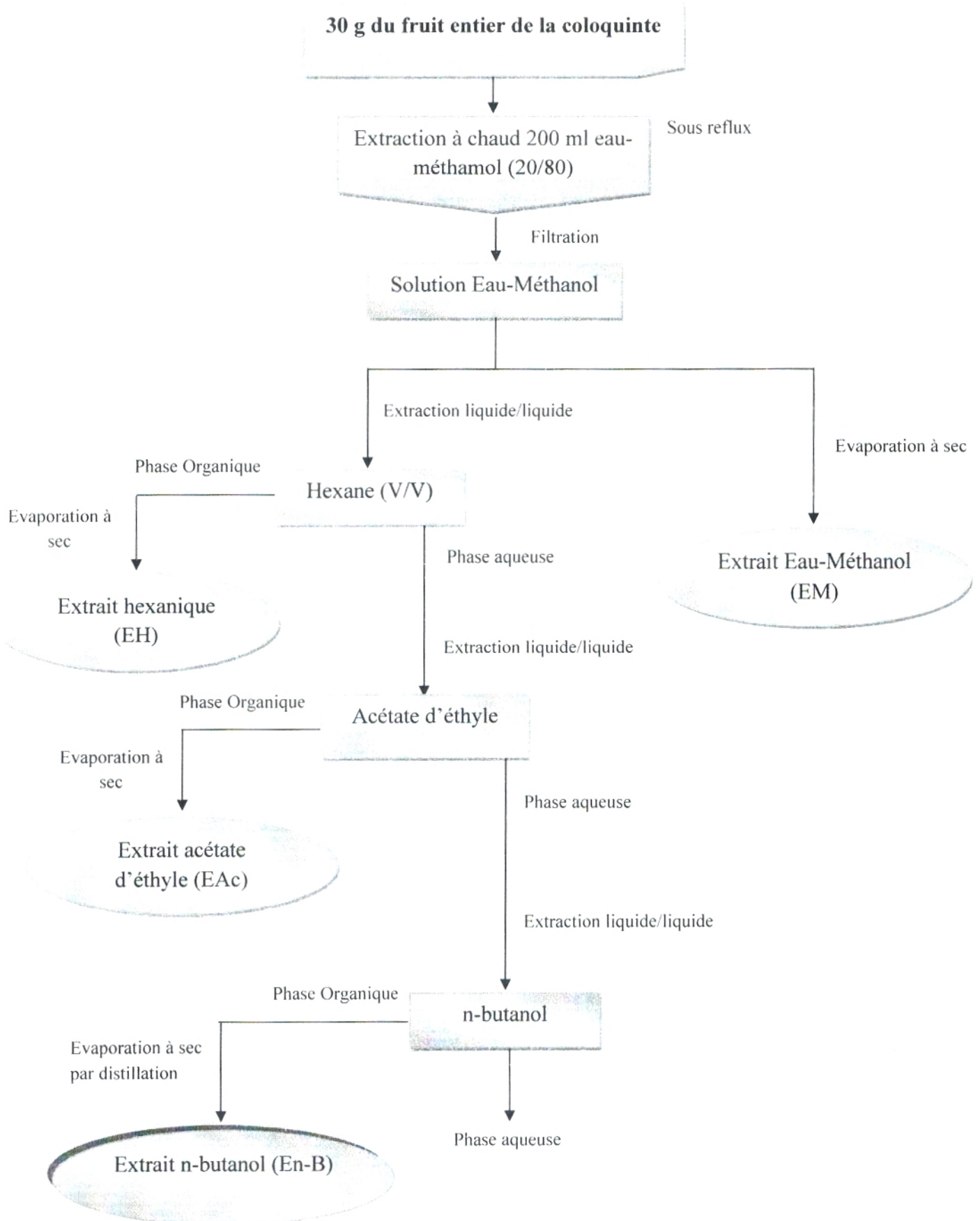


Figure 5 : Protocol de préparation des extraits organiques à partir du fruit entier de la coloquinte.

2.5 Dégraissage du fruit entier de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*)

Le dégraissage est réalisé par le Soxhlet en utilisant l'éther d'éthyle comme solvant.

- 50 g du fruit entier concassé de *Citrullus colocynthis* est placé dans la cartouche du Soxhlet puis dans le Soxhlet ;
- Introduire 150 ml d'éther d'éthyle dans un ballon rodé ;
- Chauffer à 250 C° pendant 3 heures ;
- Récupérer la cartouche et laisser séchée à 37 °C pendant 24 heures;
- Peser la matière végétales sèche ;
- Quantifier la différence entre le poids de cette matière végétale avant le dégraissage et son poids après le dégraissage.

3. Tests phytochimiques

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation effectuée sur les extraits préparés précédemment dans le but de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains composés chimiques : les flavonoïdes, les tanins, les sucres réducteurs, les coumarines, et les saponosides. Ces tests sont réalisés en présence de certains réactifs de caractérisation.

- Les flavonoïdes (réaction à la cyanidine) [Karumi et al., 2004]

Pour mettre en évidence la présence de flavonoïdes au niveau des extraits, nous avons réalisé le teste suivant :

10 gouttes de l'acide chlorhydrique HCl concentré et quelques milligrammes de tournures de magnésium sont ajoutés à 1 ml de chaque extrait (aqueux, hydro-méthanolique, acétate d'éthyle et n-butanol). La coloration rose, rouge ou jaune, après 3 min d'incubation à température ambiante, indique la présence des flavonoïdes.

- Les Tanins [karumi et al., 2004]

Dans un tube à essai contenant 1 ml de chaque extrait, ajouter 8 gouttes d'une solution diluée de chlorure ferrique FeCl₃ à 1 %. Après quelques minutes d'incubation à température ambiante, le chlorure ferrique développe une coloration verdâtre qui indique la présence des tanins catéchiques ou bleu-noirâtre qui révèle l'existence des tanins galliques.

- Les alcaloïdes [Majob, 2003]

Pour chaque extrait on réalise la procédure suivante : on ajoute 2 ml d'HCL 1 % à 1 ml de chaque extrait, le tout est chauffé au bain marie, puis on divise chaque extrait en

deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Mayer, l'autre par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

- réactif Mayer : précipité blanc jaunâtre.
- réactif Wagner : précipité rouge orangé ou brun.

Les réactifs de Mayer et de Wagner sont préparés comme suite :

- **Réactif au mercuri-iodure de potassium (Valser Mayer)** : Dissoudre 1.358 g d' HgCl_2 dans 60 ml d'eau distillée puis 5 g de KI dans 10 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.

- **Réactif à l'iodo-ioduré Wagner** : Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2 g de KI et 1.27 g de I_2 . Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

- Les quinones libres [Oloyede, 2005]

Sur un volume de chacun de nos extraits, quelques gouttes de NaOH à 1 % sont ajoutées. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

- Les anthraquinones [Oloyede, 2005]

À 1 ml de chacun de nos extraits, on ajoute 0,5 ml de NH_4OH (10 %) avec agitation. L'apparition de couleur violette indique un test positif.

- Les coumarines [Benmehdi, 2000]

Une quantité de quelques milligrammes de chaque extrait est solubilisée dans 2 ml d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont :

- La première représente un témoin ;
- La deuxième est traitée avec 0.5 ml de NH_4OH à 10 %.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines.

- Les saponosides

* Indice de Mousse

Introduire un volume de 2 ml de chaque extrait dans un tube à essai et l'ajusté à 5 ml avec de l'eau distillée. Agiter les tubes pendant 15 secondes dans le sens de la longueur puis laisser reposer pendant 20 minutes. Le résultat est positif, si la hauteur de la mousse est supérieur à 1 cm ;

* Test de Libermann-Burchard pour les stéroïdes : à 1 ml d'anhydride Acétique on ajoute 0,5 g de chaque extrait et 20 gouttes d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4). L'ensemble est

agité puis incubé pendant 30 min à température ambiante. Couleur virée du violet au bleu ou vert révèle la présence des saponosides stéroïdiennes. Une couleur rouge-maroon de la couche d'interface révèle la présence des saponosides tritérpéniques.

- Les terpénoïdes [Edeoga et al., 2005]

À 1 ml de chaque extrait, on ajoute 0.5 ml de chloroforme (CHCl_3) et 0.7 ml de H_2SO_4 concentré. La couleur verte-bleue révèle la présence des hétérosides stéroïdiens et la couleur vert violet révèle la présence des hétérosides tritérpéniques.

- Les sucres réducteurs

On ajoute 0,5 ml de liqueur de Fehling à 1 ml de chaque extrait, porter l'ensemble au bain marie. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité rouge brique.

- Les amines

On applique sur papier filtre une goutte de chaque extrait. Après séchage à 80 °C à l'étuve, le papier est pulvérisé avec une solution de la ninhydrine. Ensuite le papier est séché une 2^{ème} fois à l'étuve à 110 °C pendant 5 min, la présence des amines est observée sous forme d'une tâche jaune pour les amines secondaires ou violette pour les amines primaires.

4. Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux

- L'extrait aqueux est préparé dans l'eau distillée à une concentration de 10 mg/ml.
- L'extrait eau-méthanol est solubilisé dans un mélange eau-méthanol (20/80) à la même concentration.
- L'extrait n-butanol et acétate d'éthyle sont dissouts dans le méthanol à la même concentration.

4.1 Dosage de polyphénols totaux [Vermerius et al., 2006]

4.1.1 Principe

La méthode utilisée pour le dosage de polyphénols au niveau de nos extraits, est celle utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène [Peri et al., 1971]. La coloration produite, dont l'absorption maximum comprise entre 700 et 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait végétal [Boizot et al., 2006].

4.1.2 Mode opératoire

Le dosage de polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermerius et al., (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 (0.2 N) est ajouté au mélange, l'ensemble est incubé pendant 30 min à température ambiante. La lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm (**tableau 5**).

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations finales (2,27 ; 4,54 ; 9,1 ; 13,63 ; 18,18 ; 22,72 ; 27,27 ; 31,81 ; 36,36 ; 40,90 ; 45,45 µg/ml).

Les résultats sont exprimés en µg équivalent acide gallique par milligramme d'extrait (µg GAE/mg) [**Boizot et al., 2006**].



Tableau n° 5: Dosage de polyphénols totaux

Volumes (ml)	Concentration de l'acide gallique (µg/ml)											Extraits			
	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	EA	EM	EAc	En-B
l'acide gallique	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-	-	-
Extrait	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1
NaCO ₃	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Incubation pendant 5 min à température ambiante															
Folin Ciocalteu	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité															
Lecture au spectrophotomètre à 700 nm															

La teneur ou la concentration en polyphénols totaux présents dans nos extraits est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{polyphénols}] = a.f / c_i$$

a : Concentration de polyphénols (µg/ml) déterminée à partir de la courbe d'étalonnage ;

f : Facteur de dilution (× 22) ;

C_i : Concentration initiale de chaque extrait (10 mg/ml).

4.2 Dosage de flavonoïdes totaux [Ardestani et al., 2007]

4.2.1 Principe

Le dosage de flavonoïdes est réalisé en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm [Ardestani et al., 2007].

4.2.2 Mode opératoire

Le dosage de flavonoïdes de nos extraits est réalisé par la méthode colorimétrique décrite par Zhishen et al. (1999) et Ardestani et al. (2007).

- 500 µL de chaque extrait ou de catéchine est mélangé avec 2 ml d'eau distillée ;
- Addition de 150 µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO₂) à 15 % ;
- Incubation à température ambiante pendant 6 min ;
- Addition de 150 µl de chlorure d'aluminium (AlCl₃, 6H₂O) à 10 % ;
- Deuxième incubation à température ambiante pendant 6 min ;

- Addition de 2 ml d'hydroxyde de sodium à 4 % ;
- Le volume final est complété immédiatement à 5 ml ;
- Agiter et Incuber à température ambiante, pendant 15 min ;
- La lecture est faite à 510 nm contre un blanc (**tableau 6**) [Ardestani et al., 2007] ;

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations finales (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg/ml) ;

Les résultats sont exprimés en µg équivalent catéchine par milligramme d'extrait (µg CEq/mg).

Tableau n° 6: Dosage de flavonoïdes totaux

Volumes (ml)	Concentration de la catéchine (µg/ml)											Extraits			
	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	EA	EM	EAc	En-B
Catéchine	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-	-	-
Extrait	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	0.5	0.5	0.5
Eau Distillée	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
NaNO ₂	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Incubation 6 min à température ambiante															
AlCl ₃	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Incubation 6 min à température ambiante															
NaOH	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ajuster le Volume finale à	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Incubation pendant 15 min à température ambiante															
Lecture au spectrophotomètre à 510 nm															

La concentration des flavonoïdes totaux présents dans nos extraits est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{flavonoïdes}] = a.f / c_i$$

a : Concentration de flavonoïdes (µg/ml) déterminée à partir de la courbe d'étalonnage ;

f : Facteur de dilution (× 10) ;

C_i : Concentration initiale de chaque extrait (10 mg/ml).

5. Chromatographie sur couche mince

5.1 Principe

Pour parvenir à la séparation et au fractionnement de nos extraits bruts on utilise la chromatographie sur couche mince. Cette dernière est une technique analytique (qualitative), ses principaux éléments sont : la cuve chromatographique, la plaque (phase stationnaire), l'éluant (phase mobile) et l'échantillon. Dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. Sur une plaque de gel de silice se déplacent les composés à séparer. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant, cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composé sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances polaires migrent plus rapidement que les substances de faible polarité.

5.2 Mode opératoire

La mise en œuvre d'une CCM nécessite plusieurs étapes :

- * Préparation des extraits
- * Choix et préparation de la phase stationnaire : Les plaques utilisées sont des plaques en verre en gel de silice (Fluka) 5 x 10 cm ; Activée dans l'étuve à 100 °C pendant 1 heure.
- * Choix de la phase mobile : Plusieurs systèmes utilisés :
 - Eau : Méthanol (20/80), (30/70), (40/60) ;
 - BAW / n-butanol : Acide acétique : Eau (40/50/10) ;
 - Chloroforme : Méthanol (40/60), (60/40) ;
 - Chloroforme : Méthanol : Eau (60/25/0.2), (40/60/0.2), (50/50/0.2), (70/15/0.2) ;
 - Chloroforme : Méthanol : Acétate d'éthyle : Eau (30/40/30/0.2), (20/60/20/0.2), (20/50/30/0.2), (65/30/5/0.2), (75/20/5/0.2), (30/50/20/0.2) ;
 - Chloroforme : Méthanol : Acide acétique : Eau (65/30/5/0.2) ;
 - Chloroforme : Méthanol : Acétate d'éthyle : Acide acétique : Eau (60/25/10/05/0.2), (60/30/5/5/0.2) ;
 - Acétate d'éthyle : Acide formique : Eau (8/1/1) ;
 - Acétate d'éthyle : Chloroforme : Méthanol (65/28.5/50), (80/23.5/20), (60/23.5/40).
- * Saturation de la cuve par les solvants d'éluant ;
- * Dépôts d'échantillon en petits spots (3 à 4 fois) sous forme de points ;

- * Introduction de la plaque dans la cuve saturée ;
- * Développement du chromatogramme jusqu' à l'arrivée du solvant au front supérieur ;
- * Révélation avec la lampe UV à 254 et 366 nm ;
- * Délimitation des taches colorées à l'aide d'un crayon ;
- * Le calcul du rapport frontal R_f pour chaque constituant.

6. Effet des extraits du fruit entier de *Citrullus colocynthis* sur l'activité de l' α -amylase *in vitro*

Cette partie expérimentale consiste à étudier l'effet des extraits du fruit entier de la coloquinte (aqueux, méthanolique, hexanique, acétate d'éthyle et n-butanol) sur l'activité de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*.

6.1 Matériel

6.1.1 Réactif 3,5-dinitrosalicylique (DNSA)

Dans un Erlen Meyer, 1g de DNSA est solubilisé dans 40 ml d'eau distillée. À 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 et le réactif obtenu doit être conservé à l'abri de la lumière à + 4 °C.

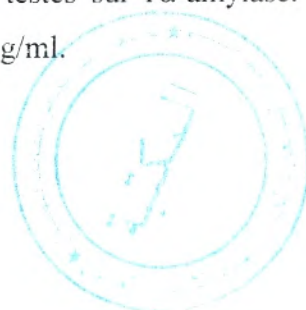
6.1.2 Solution de l' α amylase

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. L'optimum d'activité de l' α -amylase est obtenu à pH 6 et à 25 °C.

1g 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 et à 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.

6.1.3 Solution de substrat

Le substrat utilisé est l'amidon soluble de pomme de terre (Merk), préparé dans la solution tampon phosphate (0.02 M, pH 6) afin de réaliser les testes sur l' α -amylase. La concentration finale utilisée dans le milieu réactionnel est de 0.4 mg/ml.



6.1.4 Solution d'extrait de la *Citrullus colocynthis*

Différentes concentrations de chaque extrait sont préparées dans la solution tampon phosphate (0.02 M, pH 6) afin d'évaluer leur effet sur l'activité de l' α -amylase. Les concentrations finales utilisées pour l'extrait EA et EAc sont : 0.167 ; 0.500 ; 0.833 ; 1.676 et 2.500 (mg/ml). Les concentrations finales utilisées pour l'extrait EM et En-B sont : 0.500 ; 0.833 ; 1.676 et 2.500 (mg/ml).

6.2 Méthodes

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

Cette méthode est basée sur le caractère réducteur des groupements aldéhydes et cétones libre des sucres. En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation de ces fonctions provoque simultanément de la réduction 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 présents dans le milieu réactionnel [Bernfeld, 1955].

6.2.2 Mode opératoire

- * On prépare une série de 6 tubes à essai pour tester l'effet, de chaque concentration d'extrait sur l'activité de l' α -amylase. Un des tubes est un tube contrôle (pour la lecture de la DO_A : densité optique ou absorbance des tests sans extrait) et l'autre est un tube de test (pour la lecture de la DO_B : densité optique ou absorbance des tests avec l'extrait), pour chaque tube il faut préparer un blanc dans les mêmes conditions expérimentales;
- * Incuber la solution de l' α -amylase (d'activité finale de 1.3 UI/ml) à 25 °C tout au cours de la manipulation ;
- * Introduire 200 μ l de cette solution enzymatique dans tous les tubes ;
- * Ajouter 200 μ l d'extrait (chaque concentration dans un tube) dans tous les tubes à l'exception des tubes contrôles où ce volume est remplacé par 200 μ l de la solution tampon;
- * Incuber tous les tubes 5 min à 25 °C ;
- * Introduire 200 μ l de la solution d'amidon (0.4 mg/ml) dans tous les tubes à l'exception des blancs où ce volume est remplacé par 200 μ l de la solution tampon;
- * Démarrer le chronomètre une fois la solution d'amidon (substrat) est introduite dans le premier tube ;
- * Introduire 600 μ l de DNSA dans tous les tubes après 10 min d'incubation à 25 °C ;
- * Les tubes sont agités et placés dans un bain marie bouillant en même temps et pendant 5 min à 100 °C ;

- * Réaliser un choc thermique en déposant les tubes directement dans un bain d'eau glacée afin de stopper la réaction entre le maltose (produit) et le réactif DNSA;
- * Ajouter 1 ml d'eau distillée dans chaque tube, puis homogénéiser à l'aide d'un vortex;
- * Les densités optiques sont lues contre les blancs au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm.
- * Calculer le pourcentage d'inhibition pour chaque extrait en utilisant la formule suivante :

$$I \% = [(D_{O_A} - D_{O_B}) / D_{O_A}] \times 100$$

I % : Le pourcentage d'inhibition de l'extrait.

DO_A : Densité optique du tube de contrôle (sans extrait).

DO_B : Densité optique du test (avec l'extrait).



1. Extractions

L'extraction de la *Citrullus colocynthis* citée en matériel et méthodes nous a permis de récupérer nos extraits sous différents aspects et couleurs avec des rendements variables. Le **tableau n° 7** résume les caractéristiques de chacun de ces extraits.

Tableau n° 7 : Quelques caractéristiques des extraits préparés du fruit complet de *Citrullus colocynthis*

Caractéristiques	Masse (g)	Aspect	Couleur	Solubilité	Rendement (%)
Extrait aqueux	1.65	Poudre	Jaune foncé	Eau distillée	5.7
Extrait eau-méthanol	2.02	Poudre	Marron foncé	E.D/Méthanol (V/V)	6.73
Extrait hexane	-	Produit hygroscopique	Vert clair	-	-
Extrait acétate d'éthyle	1.05	Poudre	Jaune claire	Méthanol	3.51
Extrait n-butanol	1.2	Poudre	Marron orangé	E.D/Méthanol (V/V)	4

E.D : Eau distillée.

Selon le **tableau n° 7**, on remarque que la plupart de nos extraits sont récupérés sous forme de poudre de couleurs différentes, à l'exception de l'extrait hexane qui présente un aspect hygroscopique. L'extrait eau-méthanol présente un rendement d'extraction de 6.73 %, il est le plus élevé par rapport aux autres extraits suivi par l'extrait aqueux 5.7 % et l'extrait n-butanol 4 %. Par contre l'extrait acétate d'éthyle présente le rendement d'extraction le plus faible 3.51 %.

Tous les extraits se caractérisent par une solubilité totale soit dans le méthanol comme c'est le cas pour l'extrait acétate d'éthyle, soit dans un mélange eau-méthanol (V/V) pour les deux extraits eau-méthanol et n-butanol, par contre l'extrait aqueux n'est soluble que dans l'eau distillée et sa solubilité n'est que partielle.

Le dégraissage du fruit entier de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) avec soxhlet à permet de quantifier le taux de lipides que contient 50 g de cette plante. Après le calcul de la différence entre le poids de cette matière végétale avant le dégraissage et son poids après le dégraissage, le taux trouvé est de l'ordre de 8.6 % de lipides ce qui veut dire que notre plante n'est pas riche en matière grasses.

2. Tests phytochimiques

L'analyse phytochimique réalisée dans nos extraits a donné les résultats mentionnés dans le **tableau n° 8**.

La méthode de détection des différentes familles de composés chimiques consiste à l'apparition d'une coloration, floculation voir précipitation suite à l'addition de certains réactifs spécifiques. En effet, ces réactions se traduisent par un changement de couleur. L'apparition d'une floculation ou turbidité témoigne la présence et la nature des composés chimiques existants dans la coloquinte.

Tableau 8: Résultats des tests phytochimiques réalisés sur le fruit entier de la coloquinte.

Composés chimiques		EA	EM	EAc	EH	En-B
Flavonoïdes		+	+	+	-	++ (orange)
Alcaloïdes	Mayer	+	-	-	-	++
	Wagner	+++	+	+	-	+++
Tanins	Cathéchiques	-	+	+	-	++
	Galliques	-	-	-	-	-
Saponosides	Triterpénique	-	-	-	+++ (vert)	-
	Stéroïdiennes	++ (interphase rouge)	-	-	-	-
Quinones libres		-	++	++	-	+
Terpénoides		+++	+	+++	+++ (interphase marron)	++
Coumarines ($\lambda = 366$)		++	+	+++	-	+
Anthraquinones		-	-	++ (vert fluorescent)	-	-
Sucres réducteurs		+++	+++	+	-	+
Amines		+++ (mauve foncé)	++ (mauve claire)	-	-	++ (mauve claire)

(+++): Fortement présent ; (++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : Test négatif.

D'après les résultats des tests phytochimiques portés dans le tableau précédent, on remarque que l'extrait EA est très riche en alcaloïdes (Wagner), les terpénoïdes, les sucres réducteurs et amines, tandis que les stéroïdes (saponosides) et coumarines sont moyennement présents. Une faible présence est remarquée pour les flavonoïdes par contre les anthraquinones, quinones libres, triterpènes et tannins sont totalement absents dans cet extrait.

Pour l'extrait EAc, les tests révèlent une forte présence de terpénoïdes et coumarines, une présence moyenne pour les quinones libres, une faible pour les flavonoïdes, tannins catéchiques et sucres réducteurs et enfin une absence totale de saponosides et amines.

Tandis que pour l'extrait EM, la forte présence n'est observée que pour les sucres réducteurs. Une présence moyenne pour quinones libres et amines, alors que les terpènes, coumarines, tannins catéchiques, flavonoïdes et alcaloïdes (Wagner) sont faiblement présents. Pour le reste des composés on note une absence totale.

Les résultats pour l'extrait En-B montrent sa forte richesse seulement en alcaloïdes (Wagner), il est moyennement riche en flavonoïdes, tannins catéchiques, terpénoïdes et amines, et faiblement riche en quinones libres, coumarines et sucres réducteurs alors que les tannins galliques, les saponosides et les anthraquinones sont révélés négatifs dans cette analyse.

L'extrait hexanique n'a permis d'avoir que les saponosides et les terpénoïdes par rapport aux autres classes de composés cités.

3. Dosage de polyphénols totaux

Le dosage de polyphénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique au réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent acide gallique par milligramme d'extrait (μg GAE/mg), portés dans le **tableau n° 9**, en utilisant l'équation linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par l'acide gallique (**Figure 6**).

Le dosage de flavonoïdes a été effectué par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium (AlCl_3). Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent catéchine par milligramme d'extrait (μg CEq/mg) portés dans le **tableau n° 9** en utilisant l'équation linéaire de la courbe d'étalonnage de la catéchine (**Figure 7**).

Tableau n° 11 : Effet inhibiteur des extraits du fruit entier de la coloquinte sur l'activité de l' α -amylase.

		C _F (mg/ml)					Moy Do _A
		0.167	0.500	0.833	1.676	2.500	
Extrait aqueux	Moy Do _B	0.5990	0.3046	0.2271	0.0549	0.0656	0.6806
	I %	11.98	55.24	66.63	91.93	90.36	-
Extrait Eau-Méthanol	Moy Do _B	-	0.6103	0.4470	0.3903	0.2726	0.6645
	I %	-	8.15	32.73	41.26	58.97	-
Extrait n-butanol	Moy Do _B	-	0.6766	0.6425	0.4820	0.3535	0.7510
	I %	-	9.90	14.44	35.81	52.92	-
Extrait acétate d'éthyle	Moy Do _B	0.6683	0.6473	0.5871	0.6000	0.3680	0.7060
	I %	5.34	8.31	16.84	15.01	47.91	-

C_F (mg/ml) : Concentrations finales des extraits. Moy Do_B : Moyenne des densités optiques des tests (avec extraits).

I % : Pourcentage d'inhibition de l'extrait. Moy Do_A : Moyenne des densités optiques des tubes de contrôle (sans extrait).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les extraits préparés à partir du fruit entier de la coloquinte exercent in vitro un effet inhibiteur sur l'activité de l' α -amylase. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition qui varient d'un extrait à un autre en fonction de sa concentration. On remarque que chaque extrait présente des pourcentages progressifs qui augmentent en fonction de l'augmentation de concentration d'extrait (0.167 : 0.500 : 0.833 : 1.676 et 2.500 mg/ml du milieu réactionnel).

À fortes concentrations 1.676 et 2.5 mg/ml seule l'extrait EA présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé il est d'environ 90 % par rapport à l'extrait EM, En-B et EAc qui assure une inhibition de 58.97 %, 52.92% et 47.91 % respectivement.

De même à faible concentration des extraits 0.167 mg/ml seulement l'extrait EA qui présente un pourcentage élevé il est de 11.98 % par rapport à l'extrait EAc qui présente 5.34 % et aussi par rapport aux deux extraits EM et En-B qui n'exercent aucun effet sur l'activité de l' α -amylase à cette concentration.

De même à la concentration de 0.5 mg/ml l'extrait EA présente un pourcentage d'inhibition de 55.24 % de loin le plus élevé par rapport à l'extrait EM, En-B et EAc qui assure une inhibition de 8.15 %, 9.90 % et 8.31 % respectivement. De ce fait on constate que l'extrait aqueux reste le meilleur extrait qui présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé à faible et à forte concentration.

La coloquinte du nom scientifique *Citrullus colocynthis*, connue pour être utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle dans de nombreux pays pour traiter plusieurs maladies (constipation, l'œdème, infections bactériennes, cancer et les maladies du foie) dont le diabète sucré [Hireche, 2004 ; Kumar et al, 2008 ; Al-Khateeb et al., 2009 ; Atef et al., 2011 ; Nadeem Asghar, 2011]. Elle est traditionnellement employée en tant qu'abortif, insecticide, anti-inflammatoire et purgative [Al-Ghaithi, 2004 ; Atef et al., 2011]. Elle est utilisée dans les industries agroalimentaires vis à vis son effet antioxydant [Kumar et al, 2008 ; Nadeem Asghar, 2011].

Les manifestations cliniques rapportées à l'intoxication par la coloquinte comprennent des vertiges, des épigastralgies, des nausées, des vomissements et une diarrhée [El-Faraj, 1995]. El-Wasfi et al. (1994) a démontré que 800 mg/kg de l'extrait éthanolique de ses feuilles est toxique pour les rats, et entraînant la mort de 60 % des rats de la population testée après 24 heures de traitement.

Ce n'est que récemment, que les scientifiques s'intéressent de plus en plus à cette plante pour ses propriétés thérapeutiques présumées et pour sa richesse en métabolites secondaires. Ceci nous a incités de vérifier l'effet de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sur la glycémie postprandiale à travers une étude *in vitro* sur l' α -amylase tout en effectuant en premier lieu, une caractérisation des groupes chimiques présents dans les extraits : aqueux, eau-méthanol, acétate d'éthyle, hexane et n-butanol préparés à partir du fruit entier de cette plante par une étude phytochimique. En second lieu, une quantification de polyphénols et flavonoïdes totaux dans nos extraits suivie par une analyse qualitative par chromatographie sur couche mince.

Il est difficile de comparer les résultats d'extraction avec ceux de la bibliographie. Le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée [Lee et al., 2003].

À partir de 30 g du fruit entier concassé de la coloquinte on a récupéré nos extraits avec des rendements massiques considérables et supérieurs à ceux obtenus par Djedidi et al. (2009) qui sont de l'ordre de 3.6 % pour l'extrait aqueux, 4.15 % pour l'extrait eau-méthanol et 1.1 % pour l'extrait acétate d'éthyle. Nos résultats d'extraction aqueuse sont nettement supérieurs que ceux obtenus par Marzouk et al. (2010) qui sont de l'ordre de 0.93 (hammamet) ; 1.70 (Mahdia) ; 2.94 (Kessrine) ; 2.68 (Sbeitla) ; 2.44 (Sidi Bouzid) ; 2.81 (Sifax) ; et 2.76 (Medenine) et aussi supérieur de celle obtenue par Marzouk et al. (2009) qui est de l'ordre de 3,04 %. De même Bendjeddou et al. (2003) ont obtenu un rendement de 0.73 % pour l'extrait

aqueux. Le rendement d'extraction dépend de, la région et la saison de la récolte, la partie utilisée de la plante, la manière ou la méthode d'extraction, la nature et la polarité des solvants utilisés, tous ces propriétés influencent la solubilité des constituants du fruit de coloquinte utilisé.

La teneur en lipide du 50 g du fruit entier de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) est de l'ordre de 8.6 %, ce taux est nettement faible par rapport aux taux déterminés au niveau de la graine (16 à 21 %), cela explique la richesse de la graine en lipide par rapport à l'épicarpe [Otang –Ntui et al., 2010].

Le screening phytochimique de nos extraits a révélé que le fruit entier de *Citrullus colocynthis* présente une source importante de polyphénols, essentiellement, les flavonoïdes et les alcaloïdes (à l'exception de l'extrait hexanique), les tanins (à l'exception de l'extrait hexanique et aqueux), coumarines (à l'exception de l'extrait hexanique), avec l'absence des saponosides triterpéniques dans tous nos extraits (à l'exception de l'extrait hexanique qui est marqué par une forte présence) et des saponosides stéroïdiennes (à l'exception de l'extrait aqueux marqué par une présence moyenne). On note aussi une présence intéressante de sucres réducteurs dans tous nos extraits (à l'exception de l'extrait hexanique) ce qui a été confirmé par les résultats de **Ambi et al. (2007)**.

La présence de flavonoïdes dans les extraits du fruit entier de *Citrullus colocynthis* est également rapportée par plusieurs auteurs **Ambi et al. (2007)** ; **Najafi et al. (2010)** ; **Gurudeeban et al. (2010)** ; **Adebayo-Tayo et al. (2010)** ; **Gacem (2011)**. Il s'agit d'une classe très diversifiée ayant une multitude de structures distinctes par leurs propriétés chimiques [Derbel et al., 2005].

Cependant on assiste à quelques divergences entre nos résultats et ceux obtenus par **Najafi et al. (2010)** et **Gurudeeban et al. (2010)** qui ont marqué la présence des tanins dans l'extrait aqueux de *Citrullus colocynthis* alors qu'ils sont absents dans le notre. Mais ils ont confirmé la présence des tanins dans l'extrait méthanolique. L'absence des tanins dans l'extrait aqueux était aussi le résultat de l'étude réalisée par **Ambi et al. (2007)**.

Autres divergences dans les résultats obtenus par **Gacem (2011)** et **Ambi et al. (2007)** qui présumant l'absence totale de coumarines dans les deux extraits aqueux et méthanolique alors que les coumarines existent dans tous nos extraits à l'exception de l'extrait hexanique.

pourraient contenir nos extraits en utilisant une chromatographie sur couche mince avec quatre étalons : l'acide gallique, catéchine, quercétine et la myricétine. Cela nous permet d'avoir une idée globale sur les métabolites secondaires présents dans nos extraits, et de contrôler la pureté d'un composé si les conditions expérimentales sont bien déterminées.

D'après la bibliographie le système à base d'Acétate d'éthyle : Acide formique : Eau (8/1/1) est connu par la bonne séparation qu'il induit. Nos extraits sont bien fractionnés par ce système.

Le système d'éluion BAW est spécifique pour les saponosides, ce qui révèle la présence de saponosides dans nos extraits, cela est confirmé par l'étude de **Belabbaci et al. (2007)** qui ont aboutis à une bonne séparation de saponosides par le biais de ce système mais aux proportions (40/10/30).

D'autre part, la séparation, fractionnement et la caractérisation de nos extraits par CCM en utilisant plusieurs éluants et certains étalons comme l'acide gallique, myricétine, catéchine et la quercétine, nous a permis à la fois de visualiser la présence de l'acide gallique, catéchine, quercétine et la myricétine dans nos extraits et de choisir un bon système de séparation à savoir le Chloroforme : Méthanol : Acétate d'éthyle : Acide acétique : Eau (60/25/10/05/0.2), qui nous a permis d'obtenir plus de taches que le reste des systèmes en plus ce système a pu séparer une tache qui correspond à la myricétine au niveau de tous nos extraits, et une autre tache qui correspond à l'acide gallique dans les extraits EM, EAc et En-B et la catéchine pour EM et ENB. Ce qui prouve la richesse de nos extraits en substances actives.

Darwish-Sayed et al. (1974), ont montré que les graines de la coloquinte récoltées dans la région de Marsa-Matrouh (Egypte) extraites avec le chloroforme contiennent quatre glycosides cucurbitacines et huit lorsqu'elles sont extraites par l'éthanol, ce résultat est confirmé par une CCM dont l'éluant est BAW (4/1/5).

De même, **Natiq et al. (1989)**, ont identifié quatre glycosides cucurbitacines (2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacine I, 2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacine E, 2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacine L et 2-O-β-D-glucopyranosyl-(22-27) hexanorcucurbitacine I à partir de l'extrait chloroformique de la partie aérienne et les fruits de la coloquinte broyés et dégraissés récoltés dans la région de Basrah (Sud Iraq), et seulement deux glycosides cucurbitacines 2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacine I, 2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacine L à partir d'extrait éthanolique des mêmes parties utilisés. La phase mobile utilisée est chloroforme : méthanol (17/3).

Darwish-Sayed et al. (1973), ont séparé, par chromatographie sur couche mince, une choline et trois alcaloïdes à partir des graines de coloquinte récoltée dans la région de Marsa-Matrouh (Egypte) en utilisant le système chloroforme : méthanol (9/1), ces alcaloïdes étaient identifiées par RMN : ($C_{10}H_{15}NO_3$ et $C_{20}H_{32}NO$) et sont considérés comme des dérivés de la pyridine, tandis que le troisième ($C_{16}H_{24}NO_7$) a été suggéré être le dérivé de la quinoline.

Tous ces résultats nous permettent de constater que les solvants eau-méthanol et acétate d'éthyle favorisent l'extraction de flavonoïdes, alors que le chloroforme, éthanol et n-butanol permet d'obtenir les saponosides

En conclusion, selon les résultats obtenus de l'analyse chromatographique on constate que les extraits préparés à partir du fruit de la coloquinte sont riche en polyphénols essentiellement l'acide gallique et les flavonoïdes (catéchine, quercétine, myricétine). De même on suggère la présence de saponosides qui sont mis en évidence dans ces extraits par le système d'élution BAW.

En ce qui concerne l'effet inhibiteur de nos extraits sur l'activité de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*, les résultats montrent que, seule l'extrait aqueux EA du fruit entier de *Citrullus colocynthis* à fortes concentrations 1.676 et 2.5 mg/ml présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé il est d'environ 90 % par rapport aux extraits : EM, En-B et EAc qui assurent une inhibition de 58.97 %, 52.92 % et 47,91 % respectivement. De même à la concentration de 0.5 mg/ml l'extrait EA présente un pourcentage d'inhibition de 55.24 % de loin le plus élevé par rapport aux extraits : EM, En-B et EAc qui assurent une inhibition de 8.15 %, 9.90 % et 8.31 % respectivement.

Les résultats du screening phytochimique et le dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux, ont révélé que cet extrait contient : les polyphénols, les flavonoïdes, coumarines et les alcaloïdes, il est le seul extrait parmi nos extraits qui contient les saponosides stéroïdiennes et il est très riche en terpénoïdes, sucres réducteurs et amines.

Plusieurs composés phénoliques sont doués d'une activité inhibitrice de l' α -amylase, essentiellement les flavonoïdes et les tritérpénoïdes [**Sales et al., 2012**]. Les flavonoïdes l'un des principaux métabolites secondaires occupant une place prépondérante dans le groupe des polyphénols. Toute les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et possèdent le même élément structural de base comportant trois cycles A, B et C [**Sales et al., 2012**]. Elles se divisent généralement en cinq classes : flavonols, flavones, anthocyanidines, flavonones et chalcones [**Peterson, 1993**].

Le potentiel d'inhibition pour les polyphénols et les flavonoïdes est corrélé avec le nombre de groupements hydroxyles dans leur cycle B. Ces composés inhibent l' α -amylase par la formation de liaison hydrogènes entre ses groupements hydroxyles et les résidus du site de fixation (actif) de cette enzyme. Le plus grand pouvoir inhibiteur pour les flavonoïdes est assuré par les flavonols et flavones [Sales et al., 2012]. La classe de flavonoïdes a révélée sa présence dans nos extraits suivant les résultats de la CCM (catéchine, quercétine et myricétine)

D'après nos résultats, on suggère que l'extrait EA du fruit entier de *Citrullus colocynthis* agit au niveau digestif par l'inhibition de l' α -amylase avec un mécanisme non définie dans notre étude, ce qui ralentit l'absorption de glucose au niveau intestinal et réduit l'hyperglycémie postprandiale. À fortes concentrations 1.676 et 2.5 mg/ml cet extrait présente un pourcentage d'inhibition d'environ 90 %. De même à la concentration de 0.5 mg/ml ce même extrait présente un pourcentage d'inhibition de 55.24 %. Ces résultats sont meilleurs à ceux obtenus lors d'une étude faite par Prashanth et al. (2001) qui s'intéressent aux plantes antidiabétiques utilisant l'extrait éthanolique de l'épitarpe de *Punica granatum* à une concentration de 1 mg/ml dans le milieu réactionnel, cet extrait exerce un effet inhibiteur sur l'activité de l' α -amylase avec un pourcentage d'inhibition de 68.2 %. De même, Kashket et al. (1988), montrent que l'activité α -amylasique est inhibée à 50 % par les tanins du thé.

Les différents effets exercés par l'extrait EA du fruit entier de *Citrullus colocynthis* pour régulariser le désordre métabolique du diabète sucré (glucidique et lipidique) expliquent son usage en médecine traditionnelle dans le traitement de cette affection chronique à travers le monde.



À la lumière des résultats obtenus, les extraits du fruit entier de *Citrullus colocynthis* inhibent l' α -amylase essentiellement l'extrait aqueux EA. Cet extrait à fortes concentrations 1.676 et 2.5 mg/ml présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé, il est d'environ 90 %. De même à la concentration de 0.5 mg/ml ce même extrait présente un pourcentage d'inhibition de 55.24 %.

De plus nous avons déterminé un taux considérable de polyphénols et flavonoïdes totaux dans l'extrait ENB qui présente le taux le plus élevé en polyphénols et flavonoïdes, il est de 47.13 μ g équivalent acide gallique/mg d'extrait (μ g GAE/mg) et 35.68 μ g équivalent catéchine par milligramme d'extrait (μ g CEq/mg) respectivement, suivie par l'extrait EA avec une concentration de 41.34 (μ g GAE/mg) et de 11.95 (μ g CEq/mg) respectivement.

De ce fait, cette activité inhibitrice d' α -amylase est probablement liée à la présence de composés phénoliques dans cette plante.

Toutefois, il serait souhaitable d'approfondir notre étude en s'intéressant notamment à :

- La recherche, l'identification et la caractérisation de composé (s) présent (s) dans les différents extraits responsables de l'efficacité antidiabétique de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) ;
- Élaboration du mécanisme d'action en réalisant une cinétique (détermination des paramètres cinétiques) pour déterminer le type d'interaction enzyme-extrait ;
- Comparaison des résultats avec celles obtenues par un contrôle exemple l'acarbose ;
- Étude de l'action inhibitrice sur de l' α -glucosidase dont le but est de confirmer l'effet inhibiteur sur l'absorption intestinale des glucides.

ADA: American Diabetes Association; 2008. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 31: S55-60.

Adebayo-Tayo, B.C ; Adegoke, A.A ; Okoh, A.I. ; Ajibesin, K.K ; 2010. Rationalizing some medicinal plants used in treatment of skin diseases. *African Journal of Microbiology Research*. 4 : 958-963.

Aiyer, P.V ; 2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*. 4 (13): 1525-1530.

Al-Ghaithi, F; El-Ridi, M.R ; Adeghate, E ; Amiri, M.H ; 2004. Biochemical effects of *Citrullus colocynthis* in normal and diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. xxx: 1-7.

Ali, M.A ; Pandey, A.K ; 2007. Cucurbitaceae of Bihar: diversity and conservation. *Global Biodiversity Status and Conservation*. Trivedi Editor, Pointer Publisher, Jaipur, Rajasthan, India, pp. 257–263.

Al-Khateeb, M ; Dallak, M ; Al-Hashem, F ; Bashir, N ; Abbas, M ; Elessa, R ; Khalil, M ; 2009. *In vivo*, acute, Normo-Hypoglycemic, Antihyperglycemic, Insulinotropic Actions of Oally Administration Ethanol Extract of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrab Pulp. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 5(3): 118-125.

Ambi, A.A ; Abdurrahman, E.M ; Sule, M.I ; Pateh, U.U ; Abdurrahman, Y.R ; Ibrahim, N.D.G ; 2007. Phytochemical screening and histopathological studies on the seeds of *Citrullus colocynthis* in albino rats. *Nig. Journ. Pharm. Sci.* 6(2) : 7-13.

Andrade-Cetto, A, Becerra-Jiménez, J ; Cárdenas-Vázquez, R ; 2008. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacol.* 116 (1): 27-32.

Arbouche Lezoul, Z ; 2007. Les effets du traitement substitutif post ménopausique chez la diabétique de type 2, sur le métabolisme des lipoprotéines et le métabolisme glucidique. Thèse de doctorat en sciences médicales. Université d'Alger.

Ardestani, A ; Yazdanparast, R ; 2007. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *teucrium poluim* on *in vitro* protein glycoxydation, food and chemical toxicology. 45 : 2402-2411.

Atef, E.A.E.B ; Hatem, K.A ; 2011. Effect of *Citrullus colocynthis* in ameliorate the oxidative stress and nephropathy in diabetic experimental rats. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. II (II) : 1-10.

Atole ,S ; Jangde, C ; Philip, P ; Rekhe, D ; Aghav, D ; Waghode, H ; Chougule, A ; 2009. Safety Evaluation Studies of *Citrullus Colocynthis* for diabetes in Rats. *Veterinary World*. 2 (11) : 423-425.

Attia, C ; 2008. Gestion du diabète au travail. Thèse de doctorat en Médecine. Université Paris Descartes.

Azzi, R ; 2007. Contribution à la recherche des effets antidiabétiques des alcaloïdes et glucosides cucurbitacines extraits de graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat rendu diabétique par la streptozotocine. Mémoire de Magistère en biochimie. Université de Tlemcen.

Belkhadir, J ; El-Alaoui, Z; 1993. Approche epidemiologique du diabete en milieu Marocain. Médecine du Maghreb n°37.

Benariba, N ; Djaziri, R ; Zerriouh, B.H ; Bouchrit, K ; Louchami, K ; Sener, A ; Malaisse, J.W ; 2009. Antihyperglycemic effect of *Citrullus colocynthis* seeds aqueous extracts in streptozotocin-induced diabetes in rats. MEFRED Journal. 2: 71-77.

Benariba, N ; 2003. Contribution à l'étude des extraits de graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar rendu diabétique par la streptozotocine. Mémoire de Magistère en Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Tlemcen.

Benarous, K ; 2006. Effets des extraits de quelques plantes medicinales locales sur les enzymes alpha amylase, trypsine et lipase. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état en Biologie. Université Amar Telidji Laghouat, Algérie.

Bendjeddou, D ; Lalaoui, K ; Satta, D ; 2003. Immunostimulating activity of the hot water-soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpinia galanga* and *Citrullus colocynthis*. Journal of Ethnopharmacology. 88 : 155-160.

Benlahcene, Y ; 2010. Contribution à l'étude de l'effet de l'extrait eau-méthanol des graines de *Citrullus colocynthis* sur l'hyperglycémie des rats mâles rendus diabétiques par la streptozotocine. Mémoire de master en biologie moléculaire et cellulaire. Université de Tlemcen.

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

Bentabet, N ; 2010. Contribution à l'étude d'extrait acétate d'éthyle des graines de "*Citrullus colocynthis*" sur l'hyperglycémie des rats mâles "*Wistar*" rendu diabétiques par la streptozotocine. Mémoire de Master en Biochimie Appliquée, Université de Tlemcen.

Bentabet, N ; 2010. Contribution à l'étude de l'effet de l'extrait d'acétate d'éthyle des graines de *Citrullus colocynthis* chez le rat mâle rendu diabétique par la streptozotocine. Mémoire de master en biologie moléculaire et cellulaire. Université de Tlemcen.

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.

Bnouham, M ; Merhfour, F ; Ziyat, A ; Legssyer, A ; Aziz, M ; Mekhfi, H ; 2010. Antidiabetic effect of some medicinal plants of Oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. Human and Experimental Toxicology. 29(10) 865-871.

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. pp79-82.

Bompard-Gilles, C; Rousseau, P; Rougé, P ; Payan, F ; 1996. Substrate mimicry in the active center of a mammalian α -amylase: structural analysis of an enzyme-inhibitor complex. Structure. 4:1441-1452.

Chabane Sari, D ; Magnan, C ; 2008. Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. Diabetes & Metabolism. 35 : 178-179.

Chamahi, S ; 2008. Les antidiabétiques Oraux : les nouvelles molécules. Société Tunisienne de médecine interne Soins-Infirmiers. Chem. 51 : 7292-7295.

Chibane , A ; Attif, M.L ; Makhlouf, L ; Lanasri, N ; Biad, A ; 2008. Prévalence du diabète de type 2 dans une banlieue d'Alger. Diabetes and metabolism. 34(3) : H74.

Couque, A ; 2010. Une étude descriptive de l'alimentation des patients originaires d'Afrique de l'Ouest diabétiques en France. Thèse de doctorat en médecine. L'hôpital Delafontaine à Saint Denis.

Darwish-Sayed, M ; Balbaa S.I ; Afifi M.S.A ; 1974. The glycosidal content of the different organs of *Citrullus colocynthis*. Planta Medica. 26: 293-298.

Darwish-Sayed, M ; Balbaa, S.I ; Afifi, M.S.A ; 1973. Nitrogenous base of the different organs of *Citrullus colocynthis*. Planta Medica. 24(3) : 260-265.

Delazar, A ; Gibbons, S ; Kosari, A.R ; Nazemiyeh, H ; Modarressi, M ; Nahar, L ; Satyajit, D ; 2006. Flavone C-Glycosides and cucurbitacin Glycosides from *citrullus colocynthis*. DARU. 14 (3): 109-114.

Derbel, S ; Ghedira, K ; 2005. Les phytonutriments et leur impact sur la santé. Phytothérapie et nutrition. 03(01) : 28-34.

Devin, A ; 2010. Etablissement de l'implication des α - et β - amylases et des α -glucanes phosphorylases au cours de la dégradation de l'amidon dans la feuille d'*Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat en biologie. Université des sciences et technologies de Lille. Ecole doctorale Biologie Santé.

Dey, L.M.D ; Anoja, S ; Attele, D.D.S, Chun-Su-Yuan, M.D ; 2002. Alternative Therapies for Type 2 Diabetes. Alternative medicine Review. 7 (1):45-58.

Djedidi, R ; Sahi, R ; 2009. Contribution à l'étude de l'activité antioxydante des extraits des graines de *citrullus colocynthis*. D.E.S en biologie moléculaire et cellulaire. Université de Tlemcen.



Donga, J.J ; Surani, V.S ; Sailor, G.U ; Chauhan, S.P ; Seth, A.K ; 2011. A systematic review on natural medicine used for Therapy of diabetes mellitus of some Indian Medicinal plants. An international journal of pharmaceutical sciences. Pharma Science Monitor. 2 (1): 0976-7908.

Drouin,P ; Blickle, J.F, Charbonnel, B ; Eschwege, E ; Gguillausseau, P.J ; Plouin, P.F ; Daninos, J.M ; Balarac, N; Sauvanet, J.P ; 1999. Diagnostique et classification du diabète sucré : les nouveaux critères. Diabetes &Metabolisme. 25 : 72-83.

Ducobu, J ; 2007. Les antidiabétiques oraux en 2003. Médecine. 35(4) :155-157.

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. Phytothérapie. 5(4):194-203.

Edeoga, H.O ; Okwu, D.E ; Mbaebi, B .O ; 2005. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. African Journal of Biotechnology, 4: 685-685.

El Ghou, J; Smiri, M ; GhrabS ; Naceur, A. Boughattas D; Ben-Attia, M ; 2011. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of traditional aqueous extract of *Zygophyllum album* in streptozotocin diabetic mice. Pathophysiology 19: 35–42.

El-Faraj, S ; 1995. Hemorrhagic colitis induced by *Citrullus colocynthis*. Annal Tropen parasitology. 89 (6) : 695-696.

El-Wasfi, I.A ; 1994. Some pharmacological studies on *Citrullus colocynthis*. Journal of Herbs spices and material plants. 2(2): 65-79.

Faiveley, M ; 2010. Procédés biochimiques et chimiques en agroalimentaire. Produits d'origine végétale. Fabrication des bières. Techniques-ingénieur. ENILBIO Poligny. France.

Ferlié, C ; 2011. Des exemples de plantes dans le diabète de type 2 : activité et prévention. Thèse pour le diplôme de docteur d'état en pharmacie. Université de Lille 2. Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille.

Friedlander, G ; Bouvier, M ; 2005. Syndrome métabolique : quelle définition pour quel(s) traitement(s) ?. Médecine sciences. 21(12): 1045-1053.

Gacem, M.A ; 2011. Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Mémoire de Magister en biologie, Option : Microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbah-Ouargla.

Ghadamyari, M ; Hosseinaveh, V ; Sharifi, M ; 2010. Partial biochemical characterization of α - and β -glucosidases of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker. Comptes Rendus Biologie. 333 (3): 197-204.

Grimaldi, A ; 2000. Diabétologie. Université Pierre et Marie Curie. Faculté de médecine.

Gurudeeban, S ; Rajamanickam, E ; Ramanathan, T ; Satyavani, K ; 2010. Antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* in gulf of mannar. International Journal of Current Research. 2 : 078-081.

Hamza, N ; 2011. Effets préventif et curatif de trois plantes médicinales utilisées dans la Wilaya de Constantine pour le traitement du diabète de type 2 expérimental induit par le régime « *high fat* » chez la souris C57BL/6J Inhibiteurs α -glucosidases. Thèse pour l'obtention de doctorat en science alimentaire (nutrition). Université Mentouri de Constantine.

Heslot, H ; 1996. L'ingénierie des protéines et ses applications. Lavoisier Technique et Documentation. 424-433.

Hireche, M ; 2004. Effets des plantes médicinales sur les maladies cardiovasculaires. Biologie et Médecine. Diplôme d'études supérieures en biochimie. Université d'ES SENIA. Oran.

IDF: International Diabetes Federation ; 2000. Diabetes Atlas, 1st ed., Brussels, Belgium.

IDF: International Diabetes Federation ; 2003. Diabetes Atlas, 2nd ed., Brussels, Belgium.

IDF: International Diabetes Federation ; 2006. Diabetes Atlas, 3rd ed., Brussels, Belgium.

IDF: International Diabetes Federation ; 2009. Diabetes Atlas, 4th ed., Brussels, Belgium.

Iulek, J ; Octavio Luiz, F ; Marcio, S ; Christiane Trevisan, S ; Carlos Bloch J.r, John Rigden, D ; Maria, F; Grossi, S ; 2000. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye) Brazil. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 32 : 1195-1200.

Kalubim, A ; Mendoza, R ; Dieudonné, P ; Nichweki, M ; 2010. Soins infirmiers et participations aux soins des immigrés sub-sahariens diabétiques de type 2. Institut Supérieur d'Enseignement Infirmier associé à l'Université Catholique de Louvain.

Kambouche, N ; Merah, B ; Derdour, A ; Bellahouel, S; Bouayed, J ; Dicko, A ; Younos, C ; Soulimani, R.; 2009. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of *Anabasis articulata* (Forssk) Moq (Chenopodiaceae), an Algerian medicinal plant. African Journal of Biotechnology. 8 (20) : 5589-5594.

Kambouche, N ; Merah, B ; Derdour, A ; Bellahouel, S; Younos, C; Soulimani, R ; 2011. Activité antihyperglycémique d'un stérol β -sitoglycoside isolé de la plante *Anabasis articulata* (Forssk) Moq. Phytothérapie. 9: 2-6.

Karumi, Y ; Onyeyili, P.A ; Ogugb uaja, V.O ; 2004. Identification of active principes of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. J. Med. Scien. 4: 179-182.

Kashket et al., 1988. Inhibition of salivary amylase by water soluble extract of tea. Arch oral Biol. 33 : 845-846.

Khacheba, I ; Benamar, H ; 2008. Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur l'alpha – amylase. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie. Université Amar Telidji – Laghouat.

Klein, F. M ; 2009. Relations entre le diabète sucre de type 2 et l'amyloïdose chez le chat : étude bibliographique. Thèse docteur vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Kouame, L ; Ahipo-Due, E ; Niamke, S ; Kouame, F ; Alphonse Kamenan ; 2005. Synthèses enzymatiques de neoglucoconjugués catalysés par l' α -glucosidase purifiée de la blatte *Periplaneta americana* (Linnaeus). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 9 (1): 35-42.

Kumar, S ; Kumar, D ; Manjusha, S ; Saroha, k ; Singh, N ; Vashishta, B ; 2008. Antioxydant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* schrad metabolic fruit extract. Acta pharm; 58 : 215-220.

Kumar, S ; Narwal, S ; Kumar, V ; Prakash, O ; 2011. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. Pharmacognosy Reviews. 5(9): 19-29.

Larger,E ; 1997. Mécanisme d'action des antidiabétiques oraux. Médecine thérapeutique. 3 : 97-102.

Lee, K.W ; Kim, Y.J ; Lee, H.J ; Lee, C.Y ; 2003. Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. J. Agric. Food Chem. 51 : 7292-7295.

Lev, E ; Amer, Z ; 2002. Ethnopharmacology survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. Journal of Ethnopharmacology. 82 : 131-145.

MacGregor, E.A; Janeček, S ; i Svensson, B ; 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. Biochimica et Biophysica Acta 1546 : 1-20.

Majob, F ; Kamalinejab, M ; Ghaderi, N ; Vahidipour, H.R ; 2003. Phytochemical screening of some species of Iranian plants. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 77-82.

Malek, R ; Belateche, S ; Hamdi-Chrif, M ; Touabti, A ; Bendib, W ; 2001. Prevalence of type 2 diabetes mellitus and glucose intolerance in the Stif area (Algeria), Diabetes Metab. 27 (2 pt 1) : 164-171.

Malek, R; 2008. Épidémiologie du diabète en Algérie : revue des données, analyse et perspectives. Médecine des maladies Métaboliques. Vol. 2 - N°3.

Marzouk, B ; Marzouk, Z ; Haloui, E ; Fenina, N ; bouraoui, A ; Aouni, M ; 2010. Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia. J. Ethnopharmacol. 128 : 15-19.

Marzouk, B ; Marzouk, Z ; Décor, R ; Mhadhebi, L ; Fenina, N ; Aouni, M ; 2010. Antibacterial and antifungal activities of several populations of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. immature fruits and seeds. Journal de Mycologie Médicale. 20 : 179-184.

Marzouk, B., Marzouk, Z., Décor, R., Edziri, H., Haloui, E., Fenina, N. & Aouni, M., 2009. Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Medenine. J. Ethnopharmacol. 125 : 344-349.

Mbodj, N.A ; 2003. Etude de l'activité antidiabétique des extraits acetoniques, méthanoliques et hexaniques de *vernonia colorata* (willd/drake composées) chez des rats wistar. Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Faculté de médecine, pharmacie et d'odontostomatologie.

Medjdoub, A ; 2009. Contribution à l'étude de l'effet antihyperglycémiant de l'extrait d'acétate d'éthyle des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar rendu diabétique par la streptozotocine. Mémoire de Master en Biologie Moléculaire et Cellulaire. Université de Tlemcen.

Medjdoub, H ; 2006. Etude Phytochimique et Activité Biologique de *Zygophyllum geslini* Coss. Mémoire de magistère en Biochimie. Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen.

Mezouar, D ; 2007. Contribution à l'étude d'effets antidiabétiques des alcaloïdes extraits des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat rendu diabétique par la streptozotocine. Mémoire de D.E.S en Biochimie. Université de Tlemcen.

Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, 2005. Organisation mondiale de la santé. Algérie Enquête STEPS 2003, tech. rep. Ministry of Health Algeria, World Health Organization; 2005.

Moreno, A ; Damian-Almazo, J.Y ; Miranda, A ; Saab-Rincon, G ; Gonzalez, F ; Lopez, F ; Lopez-Munguia, A ; 2010. Transglycosylation reactions of *Thermotoga maritime* α -amylase. Enzyme and microbial Technology. 46: 331-337.

Muralikrishna, G ; Nirmala, M ; 2005. Cereal α -amylases—an overview. Carbohydrate Polymers. 60 : 163-171.

Nadeem Asghar, M ; Ullah Khan, I ; Bano, N; 2011. *In vitro* antioxidant and radical-scavenging capacities of *Citrullus colocynthis* (L) and *Artemisia absinthium* extracts using promethazine hydrochloride radical cation and contemporary assays. Food Science and Technology International. 17(5): 481-494.

Najafi, S ; Sanadgol, N ; Sadeghi, N.B ; Ashofteh, M.B ; Sanadgol, E ; 2010. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad against *Staphylococcus aureus*. Journal of Medicinal Plants Research. 4(22) : 2321-2325.

Natali, A ; Ferrannini, E ; 2006. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. Diabetologia.49: 434-440.

Noubel, J ; 2009. Prise en charge des patients diabétiques dans un groupement interprofessionnel de santé territoriale, évaluation de 52 patients du groupement des

professionnels de santé du pays Beaunois. Thèse pour obtenir le grade de docteur en médecine. Université de Bourgogne.

Odhav, B ; Kandasamy, T ; Khumalo, N ; Baijnath, H. 2010. Screening of African traditional vegetables for their alpha-amylase inhibitory effect. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(14): 1502-1507.

Oloyede, O.I ; 2005. Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*, *Pakistan journal of nutrition*. 4 : 379-381.

OMS (Organisation Mondiale de la santé) et IDF ; 2009. Agissons contre le diabète. Initiative de l'organisation mondiale de la santé et de la fédération internationale du diabète.

OMS, Rapport de l'approche Step Wise - Algérie ; 2005. Mesures de facteurs de risque des maladies non transmissibles dans deux zones pilotes (Approche Step Wise). Direction de la prévention.

Otang-Ntui, V ; Sher-khan, R ; Poh-Chin, D ; Nakamura, I ; Mii, M ; 2010. An efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of "Egusi" melon (*Colocynthis citrullus*). *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 103:15-22.

Peri, C ; Pompei, C ; 1971. Estimation of different phenolic groups in vegetable extracts, short communication, *phytochemistry* 10 : 2187-2189.

Peterson, G ; Barnes, G ; 1993. Genistein and Biochanin A Inhibit the Growth of Human Prostate Cancer Cells but not Epidermal Growth. *Prostate*. 22, 335.

Prashanth, D ; Padmaja, R ; Samiulla, D.S ; 2001. Effect of certain plant extracts on α -amylase activity. *Fitoterapia*. 72 : 179-181.

Qian, M ; Spinelli, S ; Driguez, H ; Payan, F ; 1997. Structure of a pancreatic α -amylase bound to a substrate analogue at 2.03 Å resolution. *Protein Science*. 6 : 2285-2296.

Ramasubbu, N ; Ragunath, C ; Michra, J.P ; 2003. Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase. *J. Mol. Biol*. 325: 1061-1076.

Ramasubbu, N ; Ragunath, C ; Sundar, K ; Mishra, P ; Gyémánt, G ; Kandra, L ; 2005. Structure-function relationships in human salivary α -amylase : role of aromatic residues. *Biologia, Bratislava*, 60/Suppl.16: 47-56.

Roglic, G ; Unwin, N ; 2010. Mortality attributable to diabetes: Estimates for the year 2010. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 87 : 15-19.

Roglic, G ; Unwin, N ; Bennett, P.H; Mathers, C ; Tuomilehto, J. Nag, S et al. ; 2005. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000, *Diab. Care*. 28 : 2130-2135.

Rousseau, V ; 2004. Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis à vis de la microflore vaginale. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Filière :

Microbiologie et Biocatalyse Industrielle Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries.

Saha, S ; Verma, R ; 2012. Inhibitory potential of traditional herbs on α -amylase activity. *Pharm Biol.* 50(3): 326-331.

Said, O ; Khalil, K ; Fulder, S ; Azaizeh, H ; 2002. Ethnopharmacology survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and West Bank region. *Journal of Ethnopharmacology.* 83 : 251-265.

Sales, P.M ; Souza, P.M ; Simioni, L.A ; Magalhães, P.D.O ; Damaris, S ; 2012. α -amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 15(1) 142-183.

Sauer, J ; Sigurskjold, B.W ; Christensen, U ; Frandsen T.P ; Mirgorodskaya, E ; Harrison, M ; Roepstorf, P ; Svensson, B ; 2000. Glucoamylase : structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1543 : 275-293.

Sawaya, W.N ; Dagher, N.J ; Khalil, J.K ; 1986. *Citrullus colocynthis* seed as a potential source of protein for food and feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 34(2) : 285-288.

Schäfer, A ; Högger, P ; 2007. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit α -glucosidase. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 77 : 42- 54.

Schmid, R.D ; 2005. Atlas de poche de Biotechnologie et de Génie Génétique. Flammarion Médecine-science.

Scriban, R ; 1993. Biotechnologie. 4^{ème} édition. Lavoisier Technique et Documentation.

Sebbagh, N ; Cruciani-Guglielmacci, C ; Ouali, F ; Berthault, M.F ; Rouch, C ; Zerriouh, B ; 2009. Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes and Metabolism.* 35(3): 178-184.

Shaw, J ; Sicree, R ; Zimmet, P ; 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 87 : 4-14.

Shinde J, Taldone T, Barletta M, 2008. Alpha-glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini*. Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydr. Res.* 343(7) : 1278-1281.

Soro, Y.R ; 2007. Purification et caractérisation de l' α -glucosidase du suc digestif de *Archachatina ventricosa* (Achatinidae) ; Application à la synthèse de polyglucosylfructosides. Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biocatalyse industrielle. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

Subramanian, R ; Asmawi, M.Z ; Sadikun, A ; 2008. In vitro alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta. Biochim. Pol.* 55(2) : 391-398.

Uchida, T ; Kawai, J ; Fujitani, Y ; Kawamori, R ; Watada, H ; Hirose, T ; 2010. Efficacy and adverse effects of low-dose nateglinide in early type 2 diabetes: comparison with acarbose in a crossover study. *The Japan Diabetes Society 2010. Diabetol Int.* 1: 35-41.

Unwin, N ; Gan, D ; Whiting, D ; 2010. The IDF Diabetes Atlas: Providing evidence, raising awareness and promoting action. *Diabetes research and clinical practice.* 87: 2-3.

Unwin, N ; Sobngwi, E ; Alberti, K.G.M.M ; 2001. Type 2 diabetes : the challenge of preventing a global epidemic. *Diabetes international.* 11: 4-8.

Van de Laar, F.A ; Lucassen, P.L ; Akkermans, R.P ; Van de Lisdonk, E.H ; Rutten, G.E ; Van Weel, C ; 2005. Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev.* 18 (2): 36-39.

Vermerius, W ; Nicholson, R ; 2006. Isolation and Identification of Phenolic Compounds, *Biochemistry*, published by springer, Dordrecht 35-62 -551-191.

Virally, M ; Blicklé, J.F ; Girard, J ; Halimi, S ; Simon, D ; Guillausseau, PJ ; 2008. Diabète de type 2: épidémiologie, physiopathologie, problèmes non résolus et perspectives thérapeutiques. *La revue de Médecine interne.* 29 (11) :881-885.

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

Wild, S ; Roglic, G ; Green, A ; Sicree, R ; King, H ; 2004. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 27(5) : 1047-1053.

Yapi, P ; 2009. Caractérisation biochimique et applications potentielles des glucosidases et de la α -galactosidase du suc digestif de la larve de *Rhynchophorus palmarum* (curculionidae). Thèse de Doctorat en Science et Technologie des Aliments. . Université d'Abobo-Adjame.

Yezdani, E ; Sendi, J ; Zibae, A ; Ghadamyari, M ; 2010. Enzymatic properties of α -amylase in the midgut and the salivary glands of mulberry moth, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochemistry/Biochimie. Comptes Rendus Biologie.* 333(1) : 17-22.

Zaoui, S ; Biémont, C ; Meguenni, K ; 2007. Approche épidémiologique du diabète en milieux urbain et rural dans la région de Tlemcen (ouest Algérien). *Santé.* 17 :15-19.

Zerriou, H ; 2010. Contribution à l'étude de l'activité antidiabétique de l'extrait acétate d'éthyle de graines de la coloquinte chez le rat Wistar. Mémoire de master en produits naturels. Département de biologie. Faculté des sciences. Université de Tlemcen.

Zhang, P ; Zhang, X ; Brown, J ; Vistisen, D ; Sicree, R ; Shaw J ; Nichols, G ; 2010. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Atlas. Diabetes Research and Clinical Practice* 87 : 293-301.

Zhishen, J ; Mengcheng T ; Jianming W ; 1999. The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64 : 555-9.

Zibae , A ; Bandani, A.R ; Kafil, M ; Ramzi, S ; 2008. Characterization of α -amylase in the midgut and the salivary glands of rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology.* 11: 201-205.





Résumé

L'objectif de notre travail est de tester *in vitro* l'effet de différents extraits du fruit entier de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*), sur l'activité de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*.

Dans ce but, le travail est initié par une extraction sélective à partir du fruit entier de la coloquinte qui aboutie à la préparation de certains extraits organiques et aqueux.

Le dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux, nous a révélé que l'extrait En-B présente le taux le plus élevé en polyphénols et flavonoïdes, il est de 47,13 μg équivalent acide gallique/mg d'extrait (μg GAE/mg) et 35,68 μg équivalent catéchine par milligramme d'extrait (μg CEq/mg) respectivement, suivie par l'extrait EA avec une concentration de 41,34 (μg GAE/mg) et de 11,95 (μg CEq/mg) respectivement. Ces résultats sont confirmés par une analyse chromatographique qui a révélé la présence de la catéchine, quercétine et myricétine

Les testes réalisés *in vitro* sur l'activité de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* montrent que tous nos extraits exercent un effet inhibiteur variable dose-dépendant, essentiellement l'extrait aqueux EA à fortes concentrations 1,676 et 2,5 mg/ml présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé il est d'environ 90 % par rapport à l'extrait EM, En-B et EAc qui assure une inhibition de 58,97 %, 52,92 % et 47,91 % respectivement. De même à la concentration de 0,5 mg/ml l'extrait EA présente un pourcentage d'inhibition de 55,24 % de loin le plus élevé par rapport à l'extrait EM, En-B et EAc qui assure une inhibition de 8,15 %, 9,90 % et 8,31 % respectivement.

En fonction de ces résultats on suggère que nos extraits peuvent exercer un effet inhibiteur *in vivo* sur l'absorption intestinale des glucides en inhibant l' α -amylase

Mots clé : *Citrullus colocynthis*, α -amylase, polyphénols, flavonoïdes, inhibition, activité d' α -amylase.



Résumé

L'objectif de notre travail est de tester *in vitro* l'effet de différents extraits du fruit entier de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*), sur l'activité de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*.

Dans ce but, le travail est initié par une extraction sélective à partir du fruit entier de la coloquinte qui aboutie à la préparation de certains extraits organiques et aqueux.

Le dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux, nous a révélé que l'extrait En-B présente le taux le plus élevé en polyphénols et flavonoïdes, il est de 47,13 μg équivalent acide gallique/mg d'extrait (μg GAE/mg) et 35,68 μg équivalent catéchine par milligramme d'extrait (μg CEq/mg) respectivement, suivie par l'extrait EA avec une concentration de 41,34 (μg GAE/mg) et de 11,95 (μg CEq/mg) respectivement. Ces résultats sont confirmés par une analyse chromatographique qui a révélé la présence de la catéchine, quercétine et myricétine

Les testes réalisés *in vitro* sur l'activité de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* montrent que tous nos extraits exercent un effet inhibiteur variable dose-dépendant, essentiellement l'extrait aqueux EA à fortes concentrations 1,676 et 2,5 mg/ml présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé il est d'environ 90 % par rapport à l'extrait EM, En-B et EAc qui assure une inhibition de 58,97 %, 52,92 % et 47,91 % respectivement. De même à la concentration de 0,5 mg/ml l'extrait EA présente un pourcentage d'inhibition de 55,24 % de loin le plus élevé par rapport à l'extrait EM, En-B et EAc qui assure une inhibition de 8,15 %, 9,90 % et 8,31 % respectivement.

En fonction de ces résultats on suggère que nos extraits peuvent exercer un effet inhibiteur *in vivo* sur l'absorption intestinale des glucides en inhibant l' α -amylase

Mots clé : *Citrullus colocynthis*, α -amylase, polyphénols, flavonoïdes, inhibition, activité d' α -amylase.